

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003756

International filing date: 04 March 2005 (04.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-062852
Filing date: 05 March 2004 (05.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 28 April 2005 (28.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

PCT/JP 2005/003756

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

07. 3. 2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 5 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 6 2 8 5 2

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号
The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

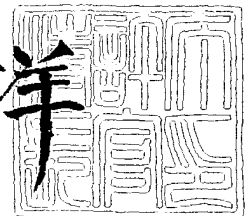
J P 2 0 0 4 - 0 6 2 8 5 2

出 願 人
Applicant(s): 花王株式会社

2 0 0 5 年 4 月 1 4 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



出証番号 出証特 2 0 0 5 - 3 0 3 3 5 6 (

【書類名】 特許願
【整理番号】 P01081603
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 1/00
C12N 15/00

【発明者】
【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内
【氏名】 遠藤 圭二

【発明者】
【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内
【氏名】 尾崎 克也

【特許出願人】
【識別番号】 000000918
【氏名又は名称】 花王株式会社

【代理人】
【識別番号】 110000084
【氏名又は名称】 特許業務法人アルガ特許事務所
【代表者】 中嶋 俊夫

【選任した代理人】
【識別番号】 100068700
【弁理士】
【氏名又は名称】 有賀 三幸

【選任した代理人】
【識別番号】 100077562
【弁理士】
【氏名又は名称】 高野 登志雄

【選任した代理人】
【識別番号】 100096736
【弁理士】
【氏名又は名称】 中嶋 俊夫

【選任した代理人】
【識別番号】 100101317
【弁理士】
【氏名又は名称】 的場 ひろみ

【選任した代理人】
【識別番号】 100117156
【弁理士】
【氏名又は名称】 村田 正樹

【選任した代理人】
【識別番号】 100111028
【弁理士】
【氏名又は名称】 山本 博人

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 164232
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

s i g A 遺伝子又は当該遺伝子に相当する遺伝子上流に孢子形成期に特異的に認識、転写されるプロモーター配列が連結してなる DNA を、ゲノム上或いはプラスミド上に有する変異バチルス属細菌。

【請求項 2】

孢子形成期に特異的に認識、転写されるプロモーター配列が、枯草菌の s i g H 遺伝子のプロモーター配列又はこれに相当する配列及び／又は枯草菌の s p o I I A オペロンのプロモーター配列又はこれに相当する配列である請求項 1 記載の変異バチルス属細菌。

【請求項 3】

バチルス属細菌が、枯草菌である請求項 1 又は 2 記載の変異バチルス属細菌。

【請求項 4】

請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項記載の変異バチルス属細菌に、異種のタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入した組換え微生物。

【請求項 5】

請求項 4 記載の組換え微生物を用いるタンパク質又はポリペプチドの製造方法。

【請求項 6】

タンパク質がセルラーゼである請求項 5 記載の製造方法。

【請求項 7】

s i g A 遺伝子又は当該遺伝子に相当する遺伝子上流に孢子形成期に特異的に認識、転写されるプロモーター配列が連結してなる DNA を、バチルス属細菌のゲノム上或いはプラスミド上に有するように構築することを特徴とする変異バチルス属細菌の構築方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】変異バチルス属細菌

【技術分野】

【0001】

本発明は、有用なタンパク質又はポリペプチドの生産に用いる宿主微生物、組換え微生物、及びタンパク質又はポリペプチドの生産方法に関する。

【背景技術】

【0002】

微生物による有用物質の工業的生産は、アルコール飲料や味噌、醤油等の食品類をはじめとし、アミノ酸、有機酸、核酸関連物質、抗生物質、糖質、脂質、タンパク質等、その種類は多岐に渡っており、またその用途についても食品、医薬や、洗剤、化粧品等の日用品、或いは各種化成品原料に至るまで幅広い分野に広がっている。

【0003】

こうした微生物による有用物質の工業生産においては、その生産性の向上が重要な課題の一つであり、その手法として、突然変異等の遺伝学的手法による生産菌の育種が行われてきた。一方、微生物遺伝学、バイオテクノロジーの発展により、特に最近では、遺伝子組換え技術等を用いたより効率的な生産菌の育種が行われるようになっており、遺伝子組換えのための宿主微生物の開発が進められている。遺伝子組換え技術を用いた生産菌育種の方法として、遺伝子の発現を調節する転写因子、特にRNAポリメラーゼのシグマ因子を増強する例が知られており、例えば、シュドモナス・フルオレセンス (*Pseudomonas fluorescens*) において、栄養増殖期において生育に必須な遺伝子の転写に参与する主要シグマ因子 (ハウスキーピングシグマ因子) をコードする r p o D 遺伝子のコピー数を増加させることにより pyoluteorin や 2,4-diacetylphloroglucinol 等の抗生物質の生産量を増加させた報告例 (例えば、非特許文献1参照) や、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicus*) においてハウスキーピングな s i g A 遺伝子を過剰発現させることにより L-リジンの発酵生産量を増加させた報告例 (例えば、特許文献1参照) などがある。

【0004】

しかしながら、これらはいずれも栄養増殖期に於いてハウスキーピングシグマ因子遺伝子の発現を増強するものであった。また、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) をはじめとするバチルス属細菌においては、シグマ因子を増強することによって有用物質の生産量を増加させるという報告はこれまでにない。

【特許文献1】国際公開第2003/054179号パンフレット

【非特許文献1】J. Bacteriol., 177, 5387, (1995)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、タンパク質又はポリペプチドの生産性向上を可能とする変異バチルス属細菌、また当該変異バチルス属細菌に異種タンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入した組換え微生物、更に、当該組換え微生物を用いるタンパク質又はポリペプチドの製造法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

バチルス属細菌は、RNAポリメラーゼのサブユニットとしてプロモーター配列の認識に参与するシグマ因子を複数有している。異なるプロモーターを認識するシグマ因子が、シグマ因子以外の複数サブユニットから成るRNAポリメラーゼコア複合体に結合することによって異なる遺伝子が転写され、これによって、ゲノム上に数千個存在する遺伝子について、状況に応じた遺伝子の発現制御を行っていると考えられている。例えば、バチルス属細菌のうち、枯草菌については17個のシグマ因子が同定されており、栄養増殖期において生育に必須な遺伝子の転写に参与する主要シグマ因子 (ハウスキーピングシグマ因

子)である *SigA*をはじめ、胞子形成過程を制御するシグマ因子 *SigH*、*SigF*、*SigE*、*SigG*、*SigK*、べん毛形成や細胞壁溶解を制御するシグマ因子 *SigD*、ある種のアミノ酸や糖の代謝を制御するシグマ因子 *SigL*、環境変化への対応を制御するシグマ因子 *SigB*や *ECF*シグマと呼ばれるシグマ因子等の存在が知られている (*Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives: From Genes to Cells, Edited by A. L. Sonenshein, American Society for Microbiology, pp289, (2002))。

【0007】

これらの中で、胞子形成過程を制御するシグマ因子は、図1に示す様に胞子形成過程の進行に伴って順次発現・活性化されることが知られている。即ち、枯草菌が栄養飢餓状態に陥ると、まずリン酸リレー系と呼ばれる複数のタンパク質間での多段階リン酸伝達系を経て胞子形成開始制御因子である *Spo0A*のリン酸化が引き起こされる (Cell, 64, 545, (1991))。リン酸化 *Spo0A* (*Spo0A~P*)の濃度上昇に伴い、*SigH*の構造遺伝子 (*sigh*)の発現を抑制しているリプレッサー *AbiB*の誘導が抑制され、結果的に *sigh*の転写が *SigA*依存的に誘導される (J. Bacteriol., 173, 521, (1991))。 *SigH*が活性化された後、非対象隔膜形成により枯草菌の細胞質は母細胞側と娘細胞側に分割され、次いで娘細胞側で *Spo0A~P*と *SigH*が共役して *SigF*の構造遺伝子 (*sigF*)を含むオペロン (*spoIIAA-spoIIB-sigF*)の転写を誘導し (Gene, 101, 113, (1991))、母細胞側では *Spo0A~P*と *SigA*が共役して *SigE*前駆体の構造遺伝子 (*sige*)を含むオペロン (*spoIIGA-sige*)の転写を誘導する (J. Bacteriol., 169, 3329, (1987))。 *SigF*はアンチ-シグマ因子 *SpoIIB*及びアンチ-アンチ-シグマ因子 *SpoIIA*、更に *SpoIIA*の脱リン酸化酵素である *SpoIIE*により活性化を制御されており (Genes Cells, 1, 881 (1996))、活性化した *SigF*はシグナル伝達タンパクである *SpoIIR*の構造遺伝子 (*spoIIR*)の転写を誘導する。娘細胞側から分泌された *SpoIIR*は母細胞側の非対象隔膜に局在する *SigE*前駆体活性化プロテアーゼである *SpoIIGA*を活性化し、これによって *SigE*の活性化が起こると考えられている (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92, 2012, (1995))。

【0008】

更に娘細胞側では *SigF*が *SigG*の構造遺伝子 (*sigG*)の転写を誘導し、母細胞側では *SigE*が *SigK*の構造遺伝子 (*sigK*)の転写を誘導するが、娘細胞側での *SigG*の活性化は母細胞側での *SigE*の活性化の後に起こり、母細胞側で *SigK*の活性化はこの後に起こる (Mol. Microbiol., 31, 1285, (1999))。

【0009】

栄養増殖期には主として *SigA*がRNAポリメラーゼコア複合体と会合して、*SigA*が認識するプロモーターを有する遺伝子、またはオペロンの転写を誘導しているが、上記の様な機構により、胞子形成期に入って他のシグマ因子が活性化されると、RNAポリメラーゼコア複合体と会合するシグマ因子の置換が起こり、*SigA*と会合するRNAポリメラーゼの量は相対的に低下することが報告されている (J. Bacteriol., 179, 4969, (1999))。この為、胞子形成期以降、*SigA*により認識されるプロモーターからの転写量は相対的に低下するものと考えられる。

【0010】

斯かる状況の下、本発明者らは、胞子形成期において特異的に認識、発現されるプロモーター配列を、主に栄養増殖期において生育に必須な遺伝子の転写に関与する主要シグマ因子である *SigA*の遺伝子に連結させることにより、*SigA*の遺伝子の発現を栄養増殖期後の胞子形成期において増強することができ、当該シグマ因子とRNAポリメラーゼコア複合体との結合量を増加させ、これによって胞子形成期以降の異種タンパク質又はリペプチドの生産性の向上が図れることを見出した。

【0011】

すなわち本発明は、*siga*遺伝子又は当該遺伝子に相当する遺伝子上流に胞子形成期に特異的に認識、転写されるプロモーター配列が連結してなるDNAを、ゲノム上或い

はプラスミド上に有する変異バチルス属細菌を提供するものである。

【0012】

また本発明は、当該変異バチルス属細菌に異種タンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入した組換え微生物、更に、当該組換え微生物を用いるタンパク質又はポリペプチドの製造法を提供するものである。

【0013】

また本発明は、s i g A 遺伝子又は当該遺伝子に相当する遺伝子の上流に孢子形成期に特異的に認識、転写されるプロモーター配列が連結してなるDNAを、バチルス属細菌のゲノム上或いはプラスミド上に有するように構築することを特徴とする変異バチルス属細菌の構築方法。

【発明の効果】

【0014】

本発明の微生物は、孢子形成期以降、RNAポリメラーゼと会合するハウスキーピングシグマ因子（枯草菌 S i g A など）の相対的な量が増強されているため、有用な異種タンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子の転写量の増加、また、タンパク生産に関わる種々の遺伝子の転写量の増加がもたらされ、該異種タンパク質又はポリペプチドを効率よく生産することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

本発明においてアミノ酸配列及び塩基配列の同一性は、Lipman-Pearson法 (Science, 27, 1435, (1985)) によって計算される。具体的には、遺伝情報処理ソフトウェア Genetyx-Win (ソフトウェア開発) のホモロジー解析 (Search homology) プログラムを用いて、Unit size to compare (ktup) を 2 として解析を行うことにより算出される。

【0016】

本発明の変異バチルス属細菌は、s i g A 遺伝子又は当該遺伝子に相当する遺伝子の上流に孢子形成期に特異的に認識、転写されるプロモーター配列が連結してなるDNAを、そのゲノム上或いはプラスミド上に有するように構築したものである。

【0017】

斯かる変異バチルス属細菌を構築するための親微生物としては、孢子形成を行なうことを特徴とするバチルス属細菌であれば、その由来は限定されず、野生型のものでも変異を施したものでもよい。中でも本発明において用いられるバチルス属細菌の好ましい例は、全ゲノム情報が明らかにされている、枯草菌 (Bacillus subtilis)、バチルス・セレウス (Bacillus cereus)、バチルス・ハロドランス (Bacillus halodulans) などが挙げられ、特に、遺伝子工学、ゲノム工学技術が確立されている点、またタンパク質を菌体外に分泌生産させる能力を有する点から枯草菌が好ましい。

【0018】

枯草菌の s i g A 遺伝子とは、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子を行い、当該遺伝子に相当する遺伝子とは、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において 70% 以上、好ましくは 80% 以上、より好ましくは 90% 以上、更に好ましくは 95% 以上、特に好ましくは 98% 以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードする遺伝子を示す。

【0019】

斯かる s i g A 遺伝子又は当該遺伝子に相当する遺伝子の上流に、孢子形成期特異的に認識、転写されるプロモーター配列を連結するが、孢子形成期に特異的に認識、転写されるプロモーター配列としては、天然由来のものでも、天然由来を改変したものでも、或いは化学合成したものでも良い。

【0020】

例えば枯草菌においては、以下 (1) ~ (6) の何れかの特徴をもつプロモーター配列が挙げられる。

(1) S p o 0 A ~ P 濃度の上昇に伴って A b r B による転写抑制が解除され、且つ S

i g Aにて認識、転写されるプロモーター配列

- (2) S i g Hにて認識、転写されるプロモーター配列
- (3) S i g Fにて認識、転写されるプロモーター配列
- (4) S i g Eにて認識、転写されるプロモーター配列
- (5) S i g Gにて認識、転写されるプロモーター配列
- (6) S i g Kにて認識、転写されるプロモーター配列

【0021】

一般に、シグマ因子は転写開始点の上流10塩基及び35塩基付近に存在する数塩基の配列を認識して結合するとされており、それぞれ-10領域、-35領域と呼ばれている。両領域の配列、両領域間の距離は、シグマ因子毎にそれぞれ共通な特徴を持つことが知られており、コンセンサス配列と呼ばれている。従って、前記(1)～(6)のプロモーター配列には、(1') S p o 0 A～P濃度の上昇に伴ってA b r Bによる転写抑制が解除され、且つS i g Aのコンセンサス配列を含む配列、(2') S i g Hのコンセンサス配列を含む配列、(3') S i g Fのコンセンサス配列を含む配列、(4') S i g Eのコンセンサス配列を含む配列、(5') S i g Gのコンセンサス配列を含む配列、(6') S i g Kのコンセンサス配列を含む配列等が例示できる。

これまでに報告されている枯草菌各シグマ因子のコンセンサス配列を表1に示す。

【0022】

【表1】

シグマ因子	コンセンサス配列		
	-35領域	領域間	-10領域
S i g A	TTGaca	14	tgnTAtaat
S i g H	RnAGGWW	11-12	RnnGAAT
S i g F	GywTA	15	GgnrAnAnTw
S i g E	Ata	16-18	cATAcant
S i g G	gnATr	15	cAtnnTA
S i g K	AC	16-18	CATAnnnT

【0023】

(Bacillus subtilis and Its Closest Relatives: From Genes to Cells, Edited by A. L. Sonenshein, American Society for Microbiology, pp289, (2002))

配列中、RはAまたはG、WはAまたはT、Nは任意の塩基をそれぞれ示す。また大文字は保存性が高く、小文字は保存性が低いことを表す。

【0024】

また、これまでに報告されているA b r Bの認識結合配列は、W a W W t t t W C A A a a a W (WはAまたはTを示す。また大文字は保存性が高く、小文字は保存性が低いことを示す)で表される(J. Bacteriol., 177, 6999, (1995))。

以上の様に、本発明に於ける孢子形成期に特異的に認識、転写されるプロモーター配列とは、前記(1)～(6)、或いは(1')～(6')の何れかの特徴を有するものである。

【0025】

(1)または(1')の何れかの特徴を有するプロモーター配列のうち、天然由来のものとしては、表2に示される枯草菌の遺伝子又はオペロンのプロモーターが挙げられ、(2)または(2')の何れかの特徴を有するプロモーター配列のうち、天然由来のものとしては、表3に示される枯草菌の遺伝子又はオペロンのプロモーターが挙げられ、(3)または(3')の何れかの特徴を有するプロモーター配列のうち、天然由来のものとしては

、表4に示される枯草菌の遺伝子又はオペロンのプロモーターが挙げられ、(4)または(4')の何れかの特徴を有するプロモーター配列のうち、天然由来のものとしては、表5に示される枯草菌の遺伝子又はオペロンのプロモーターが挙げられ、(5)または(5')の何れかの特徴を有するプロモーター配列のうち、天然由来のものとしては、表6に示される枯草菌の遺伝子又はオペロンのプロモーターが挙げられ、(6)または(6')の何れかの特徴を有するプロモーター配列のうち、天然由来のものとしては、表7に示される枯草菌の遺伝子又はオペロンのプロモーターが挙げられる。

【0026】

尚、表中の各遺伝子の名称、番号及び機能等は、Nature, 390, 249-256, (1997)で報告され、JAFAN: Japan Functional Analysis Network for Bacillus subtilis (BSORF DB)でインターネット公開 (<http://bacillus.genome.ad.jp/>、2003年6月17日更新)された枯草菌ゲノムデータベースに基づいて記載している。

【0027】

【表2】

遺伝子名	遺伝子番号
<i>sigH</i>	BG10159
<i>spo0E</i>	BG10769
<i>aprE</i>	BG10190
<i>sinI</i>	BG10753
<i>dppA</i>	BG10842
<i>abrB</i>	BG10100
<i>ftsA</i>	BG10231
<i>pbpE</i>	BG10390
<i>kinB</i>	BG10745

【0028】

(Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria; biochemistry, physiology, and molecular genetics, Edited by A. L. Sonenshein, American Society for Microbiology, pp757, (1993)、J. Bacteriol., 177, 6999, (1995))

表中、オペロンについては、転写単位の先頭の遺伝子名を示した。

【0029】

【表 3】

遺伝子名	遺伝子番号
<i>sigA</i>	BG10314
<i>spo0M</i>	BG12229
<i>spoVG</i>	BG10112
<i>citG</i>	BG10384
<i>spo0F</i>	BG10411
<i>spoVS</i>	BG11245
<i>ureA</i>	BG11981
<i>yvyD</i>	BG10740
<i>spo0A</i>	BG10765
<i>ftsA</i>	BG10231
<i>kinA</i>	BG10204
<i>spoIIAA</i>	BG10296
<i>minC</i>	BG10329
<i>phrC</i>	BG11959
<i>ytxG</i>	BG10974

【0030】

(Bacillus subtilis and Its Closest Relatives: From Genes to Cells, Edited by A. L. Sonenshein, American Society for Microbiology, pp289, (2002))

表中、オペロンについては、転写単位の先頭の遺伝子名を示した。

【0031】

【表 4】

遺伝子名	遺伝子番号
<i>dacF</i>	BG10295
<i>bofC</i>	BG11917
<i>gerAA</i>	BG10385
<i>gpr</i>	BG10438
<i>katX</i>	BG11945
<i>sspN</i>	BG14179
<i>spoIIQ</i>	BG11978
<i>spoIIR</i>	BG10937
<i>spoIIIG</i>	BG10236
<i>spoIVB</i>	BG10311
<i>ywhE</i>	BG12459
<i>yhcN</i>	BG11592
<i>lonB</i>	BG11077

【0032】

(Bacillus subtilis and Its Closest Relatives: From Genes to Cells, Edited by A. L. Sonenshein, American Society for Microbiology, pp289, (2002))

表中、オペロンについては、転写単位の先頭の遺伝子名を示した。

【0033】

【表 5】

遺伝子名	遺伝子番号
<i>spoIIP</i>	BG10439
<i>spoIID</i>	BG10766
<i>spoIIM</i>	BG10768
<i>bofA</i>	BG10087
<i>spoIIIAA</i>	BG10540
<i>spoIIID</i>	BG10408
<i>spoIVFA</i>	BG10331
<i>cotE</i>	BG10494
<i>cotJA</i>	BG11799
<i>dacB</i>	BG10527
<i>spoIVA</i>	BG10275
<i>spoIVCB</i>	BG10459
<i>spoVB</i>	BG10778
<i>spoVD</i>	BG10222
<i>spoVE</i>	BG10226
<i>spoVK</i>	BG11039
<i>spoVM</i>	BG10776
<i>spoVR</i>	BG10182
<i>spoVID</i>	BG10346
<i>glgB</i>	BG10907
<i>mmgA</i>	BG11319
<i>phoB</i>	BG10697
<i>yknT</i>	BG12251
<i>yteV</i>	BG12339
<i>safA</i>	BG13781
<i>yaaH</i>	BG10080
<i>cwlD</i>	BG11514
<i>cwlJ</i>	BG11172
<i>yjmC</i>	BG13206
<i>yfhS</i>	BG12892
<i>yoaW</i>	BG13493

【0034】

(*Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives: From Genes to Cells, Edited by A. L. Sonenshein, American Society for Microbiology, pp289, (2002))

表中、オペロンについては、転写単位の先頭の遺伝子名を示した。

【0035】

【表 6】

遺伝子名	遺伝子番号
<i>gerAA</i>	BG10385
<i>gerBA</i>	BG10640
<i>gerD</i>	BG10644
<i>csgA</i>	BG11504
<i>bofC</i>	BG11917
<i>dacF</i>	BG10295
<i>gpr</i>	BG10438
<i>spoVAA</i>	BG10892
<i>spoIII G</i>	BG10236
<i>spoVT</i>	BG10119
<i>sspA</i>	BG10786
<i>sspB</i>	BG10787
<i>sspC</i>	BG10882
<i>sspD</i>	BG10788
<i>sspE</i>	BG10789
<i>sspF</i>	BG10108
<i>sspJ</i>	BG14174
<i>sleB</i>	BG11439
<i>splA</i>	BG10202
<i>sspN</i>	BG14179
<i>spoIVB</i>	BG10311
<i>sspH</i>	BG12917
<i>sspL</i>	BG14176
<i>ybaK</i>	BG11503
<i>yhcN</i>	BG11592
<i>ywhE</i>	BG12459
<i>ycxE</i>	BG11066
<i>sspI</i>	BG12318
<i>sspK</i>	BG14175
<i>sspM</i>	BG14177
<i>sspO</i>	BG11920
<i>cwlD</i>	BG11514

【0036】

(Bacillus subtilis and Its Closest Relatives: From Genes to Cells, Edited by A. L. Sonenshein, American Society for Microbiology, pp289, (2002))

表中、オペロンについては、転写単位の先頭の遺伝子名を示した。

【0037】

【表 7】

遺伝子名	遺伝子番号
<i>cgeA</i>	BG11193
<i>cgeC</i>	BG11195
<i>cwlC</i>	BG10825
<i>cotA</i>	BG10490
<i>cotB</i>	BG10491
<i>cotC</i>	BG10492
<i>cotD</i>	BG10493
<i>cotE</i>	BG10494
<i>cotF</i>	BG10012
<i>cotH</i>	BG11791
<i>cotM</i>	BG11822
<i>cotT</i>	BG10495
<i>cotG</i>	BG11017
<i>cotSA</i>	BG11381
<i>cotV</i>	BG10496
<i>cotX</i>	BG10500
<i>cotY</i>	BG10498
<i>yobW</i>	BG12269
<i>yqeE</i>	BG11633
<i>spoIVCB</i>	BG10459
<i>spoVK</i>	BG11039
<i>spoVFA</i>	BG10781
<i>gerE</i>	BG10355
<i>sspG</i>	BG14173
<i>yfhP</i>	BG12890
<i>yabG</i>	BG10106

【0038】

(*Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives: From Genes to Cells, Edited by A. L. Sonenshein, American Society for Microbiology, pp289, (2002))

表中、オペロンについては、転写単位の前頭の遺伝子名を示した。

【0039】

以上の様に、本発明に於いて用いられる孢子形成期に特異的に認識、転写されるプロモーター配列としての好適な例としては、前記(1)～(6)、或いは(1')～(6')の何れかの特徴をもつプロモーターが挙げられる。一方、枯草菌において、SigEはRNAポリメラーゼに対してSigAより高い親和性を示すとの報告例もあることから(J. Bacteriol., 179, 4969, (1999))、より好適には、SigEが活性化する以前に転写が活性化されるプロモーターを利用することが好ましい。より好ましい当該プロモーター配列としては、Spo0A～P濃度の上昇に伴ってAbrBによる転写抑制が解除され、且つSigAにより認識、転写されるプロモーター配列(前記(1)又は(1')に相当)、又はSigHにより認識、転写されるプロモーター配列(前記(2)又は(2')に相当)が挙げられる。

【0040】

前記(1)又は(1')の何れかの特徴を有するプロモーター配列のうち、天然由来のものとしては、表1に示した枯草菌の遺伝子又はオペロンのプロモーター配列が挙げられ、中でも特に好適な例としては、枯草菌のs i g Hのプロモーター配列が挙げられる。枯草菌のs i g Hのプロモーター配列は、配列番号2に示す塩基配列における塩基番号987~1027の塩基配列、好ましくは塩基番号987~1047の塩基配列、より好ましくは塩基番号1~1047の塩基配列を含む、塩基長5000塩基対以内、好ましくは2000塩基対以内、より好ましくは1047塩基対以内の塩基配列であり、且つ当該遺伝子のプロモーターと同一のプロモータ機能を有するものである。

【0041】

また前記(2)又は(2')の何れかの特徴を有するプロモーター配列のうち、天然由来のものとしては、表2に示される枯草菌の遺伝子又はオペロンのプロモーターが挙げられ、中でも特に好適な例としては枯草菌のs p o I I A A-s p o I I A B-s i g Fオペロン(s p o I I Aオペロン)のプロモーター配列が挙げられる。枯草菌のs p o I I Aオペロンのプロモーター配列は、配列番号3に示す塩基配列における塩基番号1081~1110の塩基配列、好ましくは塩基番号1081~1118の塩基配列、より好ましくは塩基番号1~1143の塩基配列を含む、塩基長5000塩基対以内、好ましくは2000塩基対以内、より好ましくは1143塩基対以内の塩基配列であり、且つ当該遺伝子のプロモーターと同一のプロモータ機能を有するものである。

【0042】

また、本発明で用いられる孢子形成期特異的に認識、発現されるプロモーター配列としては、表1~表6記載の枯草菌の各遺伝子或いは各オペロンのプロモーター配列に相当する配列も含まれる。例えば、枯草菌のs i g H遺伝子のプロモーター配列に相当する配列としては、配列番号2に示す塩基配列における塩基番号987~1027の塩基配列、好ましくは塩基番号1081~1118の塩基配列、より好ましくは塩基番号1~1143の塩基配列に対して、1個又は複数個の塩基が置換、欠失若しくは挿入された塩基配列を含む、塩基長5000塩基対以内、好ましくは2000塩基対以内、より好ましくは1047塩基対以内の塩基配列であり、且つ当該遺伝子のプロモーターと同一のプロモータ機能を有するDNA断片が挙げられる。

【0043】

また、s p o I I Aオペロンのプロモーター配列に相当する配列としては、配列番号3に示される塩基配列における塩基番号1081~1110の塩基配列、好ましくは塩基番号1081~1118の塩基配列、更に好ましくは塩基番号1~1143の塩基配列に対して、1個又は複数個の塩基が置換、欠失若しくは挿入された塩基配列を含む、塩基長5000塩基対以内、好ましくは2000塩基対以内、より好ましくは1118塩基対以内の塩基配列であり、且つ当該オペロンのプロモーターと同一のプロモータ機能を有するDNA断片が挙げられる。

【0044】

更に、本発明で用いられる孢子形成期における転写に特異的に関与するシグマ因子により認識されるプロモーター配列には、表2又は表3記載の枯草菌の遺伝子又は、枯草菌のオペロンを構成する遺伝子のオーソログ(ortholog)遺伝子のプロモーター配列、好適には、バチルス属細菌由来の当該オーソログ遺伝子のプロモーター配列も含まれる。オーソログ遺伝子は、インターネットで公開されるMicrobial Genome Database (MBGD、<http://mbgd.genome.ad.jp/>)のCreate/view Orthologous gene tableプログラムを利用することによって見出すことができる。枯草菌s i g H遺伝子のオーソログ遺伝子の例としては、バチルス・ハロドランスのs i g H(BH0115)遺伝子や、バチルス・セレウスのBC0114遺伝子などが挙げられる。また、枯草菌のs p o I I Aオペロンを構成する各遺伝子のオーソログとしては、バチルス・ハロドランスのs i g F(BH1538)遺伝子、s p o I I A B(BH1537)遺伝子、又s p o I I A A(BH1536)、バチルス・セレウスのBC4072遺伝子、BC4073遺伝子、又BC4074遺伝子などが挙げられる。

【0045】

斯かる孢子形成期における転写に特異的に関与するシグマ因子により認識されるプロモーター配列は、上記のプロモーター配列を単独で用いる他、複数種を組み合わせる用いることができる。

【0046】

孢子形成期において特異的に認識、転写されるプロモーター配列が枯草菌の s i g A 遺伝子又は当該遺伝子に相当する遺伝子の上流に結合してなるDNAは、例えば、元来枯草菌ゲノム上に存在する s i g A 遺伝子の上流に存在する S i g A 認識プロモーター配列の上流又は下流に、孢子形成期において特異的に認識、転写されるプロモーター配列を含むDNA断片を挿入することによってゲノム上に構築することができる。尚、孢子形成期において特異的に認識、転写されるプロモーター配列を含むDNA断片を挿入する部位は、s i g A 遺伝子又は当該遺伝子に相当する遺伝子の上流であればよいが、s i g A 構造遺伝子の上流側に隣接する2000塩基対以内の領域が好ましく、1000塩基対以内の領域がより好ましく、500塩基対以内の領域が更に好ましく、1～198塩基対の領域が特に好ましい。但し、孢子形成期において特異的に認識、転写されるプロモーター配列を含むDNA断片が適切なりボソーム結合部位の配列を含まない場合には、該DNA断片を s i g A 構造遺伝子より15塩基対以上、上流に挿入することが望ましい。

【0047】

また、孢子形成期に特異的に認識、転写されるプロモーター配列を s i g A 遺伝子又は当該遺伝子に相当する遺伝子の上流側に連結したDNAはPCRなどの方法によって構築することも可能である。尚、連結部位から s i g A 構造遺伝子までの間の、元来枯草菌ゲノム上に存在する s i g A 遺伝子の上流配列に由来する配列は、0～2000塩基対であることが好ましく、0～1000塩基対であることがより好ましく、0～500塩基対であることが更に好ましく、0～198塩基対であることが特に好ましい。但し、孢子形成期において特異的に認識、転写されるプロモーター配列を含むDNA断片が適切なりボソーム結合部位の配列を含まない場合には、連結部位から s i g A 構造遺伝子までの間の、元来枯草菌ゲノム上に存在する s i g A 遺伝子の上流配列に由来する配列は15塩基対以上であることが望ましい。本発明変異バチルス属細菌を構築するためには、このようにして構築したDNAを新たに親バチルス属細菌へ導入すれば良い。

【0048】

例えば孢子形成期に特異的に認識、転写されるプロモーター配列を含むDNA断片と s i g A 遺伝子等を含むDNA断片を連結したDNA断片をPCR等の方法により調製し、親バチルス属細菌内で複製可能なプラスミドベクターにクローニングして取り込ませる方法を用いることができる。特に、本発明変異バチルス属細菌を構築するための親バチルス属細菌として枯草菌を用いる場合、複製可能なプラスミドベクターとしてはpUB110 (Plasmid, 15, 93, (1986))、pC194 (J. Bacteriol., 150, 815, (1982))、pTX14-3 (Plasmid, 30, 119, (1993)) をはじめとして既に報告のある多数のプラスミドベクターを利用することが可能である。

【0049】

或いは、孢子形成期において特異的に認識、転写されるプロモーター配列を含むDNA断片が s i g A 遺伝子等を含むDNA断片の上流に連結したDNA断片を、相同組換え等の方法によってゲノム上に導入することができる。相同組換えを利用してゲノム上にDNA断片を導入する方法については既にいくつかの報告があり (Mol. Gen. Genet., 223, 268 (1990)等)、それらの方法に従うことによって、本発明の変異バチルス属細菌を得ることができる。

【0050】

以下、より具体的にSOE (splicing by overlap extension) - PCR法 (Gene, 77, 51, (1989)) により調製された孢子形成期において特異的に認識、転写されるプロモーター配列を含むDNA断片と s i g A 遺伝子を含むDNA断片が連結したDNA断片を調製し、相同組換えを利用することによりゲノム上に当該DNA断片を導入する方法につい

て説明するが、本発明における当該DNA断片の導入方法は下記に限定されるものではない。

【0051】

本発明において、まず1回目のPCRにより孢子形成期において特異的に認識、転写される孢子形成期において特異的に認識、転写されるプロモーター配列を含むDNA断片と、ハウスキーピングシグマ因子の構造遺伝子断片、並びに薬剤耐性マーカー遺伝子断片の3断片を調製するが、この際、例えば、当該プロモーター配列を含むDNA断片の下流末端にハウスキーピングシグマ因子の構造遺伝子断片の上流側10～30塩基対配列、逆に薬剤耐性マーカー遺伝子断片の上流末端にはハウスキーピングシグマ因子の構造遺伝子断片の下流側10～30塩基対配列が付加される様にデザインしたプライマーを用いる(図2)。

【0052】

次いで、1回目に調製した3種類のPCR断片を鋳型とし、当該プロモーター配列を含む断片の上流側プライマーと薬剤耐性マーカー遺伝子断片の下流側プライマーを用いて2回目のPCRを行なうことによって、当該プロモーター配列を含む断片の下流末端及び薬剤耐性マーカー遺伝子断片の上流末端に付加したs i g A遺伝子断片配列において、s i g A遺伝子断片とのアニールが生じ、PCR増幅の結果、s i g A遺伝子の上流に孢子形成期における転写に特異的に関与するシグマ因子により認識されるプロモーター配列が連結され、且つ薬剤耐性マーカー遺伝子がその下流に連結されたDNA断片を得ることができる(図2)。

【0053】

孢子形成期に特異的に認識、転写されるプロモーター配列として枯草菌のs i g H遺伝子、或いはs p o I I Aオペロンのプロモーターを、薬剤耐性マーカー遺伝子として、クロラムフェニコール耐性遺伝子を用いる場合、例えば表8に示したプライマーセットを用いて、Pyrobest DNAポリメラーゼ(宝酒造)などの一般のPCR用酵素キット等を用いて、成書(PCR Protocols. Current Methods and Applications, Edited by B. A. White, Humana Press, pp251 (1993)、Gene, 77,61, (1989)等)に示される通常の条件によりSOE-PCRを行なうことによって、所望のDNA断片を得ることができる。

【0054】

かくして得られたDNA断片を、例えば枯草菌ゲノム上に導入する場合、枯草菌細胞内にて複製出来ないプラスミドベクター、例えばpMW219(ニッポンジーン)にクローニングし、コンピテント法等によって細胞内に取り込めると、プラスミド上のハウスキーピングシグマ因子の遺伝子領域と、ゲノム上のs i g A遺伝子領域の間で相同組換えが生じ、薬剤耐性マーカーによる選択によって、孢子形成期に特異的に認識、転写されるプロモーター配列が結合したs i g A遺伝子を含むDNA断片がプラスミドベクターと共にゲノム上に導入された細胞を分離することができる(図2)。即ち、表3に示したプライマーセットを用いて調製したDNA断片をpMW219にクローニングしたプラスミドを枯草菌細胞内に取り込ませた場合、クロラムフェニコールを含む寒天培地上に生育するコロニーを分離し、s i g H遺伝子、或いはs p o I I Aオペロンのプロモーター領域とs i g A遺伝子が連結したDNA断片がゲノム上に導入されていることを、ゲノムを鋳型としたPCR法などによって確認すればよい。

【0055】

以上は主に親バチルス属細菌として枯草菌を用いる場合について示したが、他のバチルス属細菌についても同様にして本発明の変異バチルス属細菌を得ることができる。

【0056】

かくして得られたバチルス属細菌を用いることにより、異種タンパク質又はポリペプチドの生産において、異種タンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子の転写、並びにタンパク生産に関わる種々の遺伝子の転写を行なうS i g Aが孢子形成期に発現増強される為、生産性の向上が達成される。

すなわち、S i g Aによって認識されるプロモーターの下流に目的とするタンパク質又

はポリペプチドをコードする遺伝子を結合させた後、これを本発明により得られた変異バチルス属細菌に導入することによって、栄養増殖期のみならず、孢子形成期に於いても目的のタンパク質又はポリペプチドの生産が継続するため、親バチルス属細菌に比べ、著量の目的タンパク質又はポリペプチドを生産する。

【0057】

目的タンパク質又はポリペプチド遺伝子は特に限定されず、洗剤、食品、繊維、飼料、化学品、医療、診断など各種産業用酵素や、生理活性ペプチドなどが含まれる。また、産業用酵素の機能別には、酸化還元酵素 (Oxidoreductase)、転移酵素 (Transferase)、加水分解酵素 (Hydrolase)、脱離酵素 (Lyase)、異性化酵素 (Isomerase)、合成酵素 (Ligase/Synthetase) 等が含まれるが、好適にはセルラーゼ、 α -アミラーゼ、プロテアーゼ等の加水分解酵素の遺伝子が挙げられる。具体的には、多糖加水分解酵素の分類 (Biochem. J., 280, 309 (1991)) 中でファミリー 5 に属するセルラーゼが挙げられ、中でも微生物由来、特にバチルス属細菌由来のセルラーゼが挙げられる。より具体的な例として、配列番号 4 又は 6 で示されるアミノ酸配列からなるバチルス属細菌由来のアルカリセルラーゼや、当該アミノ酸配列と 70%、好ましくは 80%、より好ましくは 90% 以上、さらに好ましくは 95% 以上、特に好ましくは 98% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるセルラーゼが挙げられる。

【0058】

また、 α -アミラーゼの具体例としては、微生物由来の α -アミラーゼが挙げられ、特にバチルス属細菌由来の液化型アミラーゼが好ましい。より具体的な例として、配列番号 8 で示されるアミノ酸配列からなるバチルス属細菌由来のアルカリアミラーゼや、当該アミノ酸配列と 70%、好ましくは 80%、より好ましくは 90% 以上、さらに好ましくは 95% 以上、特に好ましくは 98% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるアミラーゼが挙げられる。尚、アミノ酸配列の同一性は Lipman-Pearson 法 (Science, 227, 1435, (1985)) によって計算される。また、プロテアーゼの具体例としては、微生物由来、特にバチルス属細菌由来のセリンプロテアーゼや金属プロテアーゼ等が挙げられる。

【0059】

一方、前述の様に目的タンパク質又はポリペプチド遺伝子は、その上流に枯草菌 *SigA* などのハウスキーピングシグマ因子によって認識されるプロモーター配列が結合されている必要があり、更に、翻訳、分泌に関わる制御領域、即ち、リボソーム結合部位および開始コドンを含む翻訳開始領域、又、分泌用シグナルペプチド領域が適正な形で結合されていることが望ましい。例えば、特開 2000-210081 号公報や特開平 4-190793 号公報等に記載されているバチルス属細菌、すなわち KSM-S237 株 (FERM B P-7875)、KSM-64 株 (FERM BP-2886) 由来のセルラーゼ遺伝子のハウスキーピングシグマ因子で転写されるプロモーターを含む転写開始制御領域、翻訳開始領域、分泌用シグナルペプチド領域、より具体的には配列番号 5 で示される塩基配列の塩基番号 1~659 の塩基配列、配列番号 7 で示される塩基配列からなるセルラーゼ遺伝子の塩基番号 1~696 の塩基配列、また当該塩基配列に対して 70% 以上、好ましくは 80% 以上、より好ましくは 90% 以上、さらに好ましくは 95% 以上、特に好ましくは 98% 以上の同一性を有する塩基配列からなる DNA 断片、あるいは上記いずれかの塩基配列の一部が欠失した塩基配列からなる DNA 断片が、目的タンパク質又はポリペプチドの構造遺伝子と適正に結合されていることが望ましい。

【0060】

上記の目的タンパク質又はポリペプチド遺伝子を含む DNA 断片と適当なプラスミドベクターを結合させた組換えプラスミドを、一般的な形質転換法によって本発明の変異バチルス属細菌に取り込ませることによって、目的タンパク質又はポリペプチドの生産性を向上させることができる。また、当該 DNA 断片に本発明の変異バチルス属細菌ゲノムとの適当な相同領域を結合した DNA 断片を用い、本発明の変異バチルス属細菌ゲノムに直接組み込むことによって目的タンパク質又はポリペプチドの生産性を向上させることができる。

【0061】

本発明の変異バチルス属細菌を宿主とした目的タンパク質又はポリペプチドの生産は、当該菌株を同化性の炭素源、窒素源、その他の必須成分を含む培地に接種し、通常の微生物培養法にて培養し、培養終了後、タンパク質又はポリペプチドを採取・精製することにより行えばよい。

【0062】

以上より、孢子形成期における sigA 遺伝子の転写効率が向上したバチルス属細菌を構築することができ、当該変異バチルス属細菌を組換え生産の宿主細胞として用いれば有用なタンパク質又はポリペプチドを効率的に生産することができる。

【0063】

以下、実施例を用いて、本発明の変異バチルス属細菌の構築方法と、当該変異バチルス属細菌を宿主として用いたセルラーゼの生産方法について具体的に説明する。

【実施例】

【0064】

実施例1 孢子形成期に特異的に転写されるプロモーターを有する sigA 遺伝子を枯草菌ゲノム上に導入するためのプラスミドの構築

図2に示す方法と同様にして、sigH 遺伝子プロモーター或いは spoIIA オペロンプロモーターを sigA 構造遺伝子上流に連結したDNA断片を、1回交差の相同組換えを利用して枯草菌ゲノム上へ導入する為のプラスミドの構築を行った。即ち、枯草菌168株から抽出したゲノムDNAを鋳型とし、表8に示した sigAf と sigAr のプライマーセットを用いて sigA 遺伝子を含む1.2kb断片(A)をPCRにより調製した。同様に表8に示した sigHUf と sigHUr-sigA のプライマーセットを用いてゲノム上の sigH 遺伝子上流に隣接する sigH 遺伝子のプロモーターを含む1.0kb断片(B)を調製した。同様に表8に示した sigFUf と sigFUr-sigA のプライマーセットを用いてゲノム上の spoIIA オペロン上流に隣接し、sigF 遺伝子の転写を司る spoIIA オペロンのプロモーターを含む1.1kb断片(C)を調製した。またプラスミドpC194(J. Bacteriol. 150(2), 815(1982))を鋳型とし、表8に示した CmFW と Cmr-sigA のプライマーセットを用いてクロラムフェニコール耐性遺伝子を含む0.9kb断片(D)を調製した。次いで、得られた(A)(B)(D)3断片を混合して鋳型とし、表8に示した sigHUf と CmFW のプライマーセットを用いたSOE-PCRを行なうことによって、3断片を(B)(A)(D)の順になる様に結合させ、sigH 遺伝子のプロモーターが sigA 構造遺伝子上流に連結し、更にその下流にクロラムフェニコール耐性遺伝子が逆向きに結合した3.1kbのDNA断片(E)を得た。同様に(A)(C)(D)3断片を混合して鋳型とし、表8に示した sigFUf と CmFW のプライマーセットを用いたSOE-PCRを行なうことによって、3断片を(C)(A)(D)の順になる様に結合させ、spoIIA オペロンプロモーターが sigA 構造遺伝子上流に連結し、更にその下流にクロラムフェニコール耐性遺伝子が逆向きに結合した3.2kbのDNA断片(F)を得た。3.1kbのDNA断片(E)と3.2kbのDNA断片(F)をそれぞれ枯草菌細胞内では複製できない大腸菌用プラスミドベクターpMW219の SmaI 制限酵素切断点に挿入し、孢子形成期に特異的に転写されるプロモーターを有する sigA 遺伝子を枯草菌ゲノム上に導入するためのプラスミドpMWP H sigA 及びpMWP F sigA を構築した。

【0065】

また上記のプライマーのうち、sigAf 及び sigFUr-sigA に代えて、それぞれ表8に示す sigAmf 及び sigFUr-sigAm を用いて同様の操作を行なうことにより、pMWP F sigA における sigA 遺伝子の開始コドン(ATG)が開始コドンとして認識されない(ATA)に置換されたpMWP F sigAm を構築した。

【0066】

実施例2 孢子形成期に特異的に転写されるプロモーターを有する sigA 遺伝子の枯草菌168株ゲノムへの導入 孢子形成期に特異的に転写されるプロモーターを有する sig

gA遺伝子、又は開始コドン(ATG)が(ATA)に置換されたsigA遺伝子(sigAm)を枯草菌ゲノム上に導入するためのプラスミドpMWP H sigA、pMWP F sigA、及びpMWP F sigAmを用いてコンピテント法によりそれぞれ枯草菌168株の形質転換を行ない、クロラムフェニコールを含むLB寒天培地上に生育したコロニーを形質転換体として分離した。得られた形質転換体から抽出したゲノムを鋳型としてPCRを行なうことによって、ゲノム上のsigA遺伝子とプラスミド上のsigA遺伝子又はsigAmの間での相同組換えにより、孢子形成期に特異的に転写されるプロモーターを有するsigA又はsigAmが、1.2 kb断片(D)と共にゲノム内に挿入されたことを確認し、これらを168PH sigA株、168PF sigA株、及び168PF sigAm株と命名した。

【0067】

実施例3 枯草菌変異株のアルカリセルラーゼ分泌生産評価

実施例2にて得られた3種類の枯草菌変異株(168PH sigA株、168PF sigA株、及び168PF sigAm株)、及び対照として枯草菌168株に、バチルスエスピー(*Bacillus* sp.) KSM-S237株由来のアルカリセルラーゼ遺伝子(特開2000-210081号公報)をコードするDNA断片(3.1 kb)がシャトルベクターpHY300PLK(ヤクルト)のBamHI制限酵素切断点に挿入された組換えプラスミドpHY-S237を、プロトプラスト形質転換法によって導入した。これによって得られた菌株を10 mLのLB培地で一夜37℃で振盪培養を行い、更にこの培養液0.05 mLを50 mLの2×L-マルトース培地(2%トリプトン、1%酵母エキス、1% NaCl、7.5%マルトース、7.5 ppm硫酸マンガン4-5水和物、15 ppmテトラサイクリン)に接種し、30℃で3日間、振盪培養を行った。培養後、遠心分離によって菌体を除いた培養液上清のアルカリセルラーゼ活性を測定し、培養によって菌体外に分泌生産されたアルカリセルラーゼの量を求めた。この結果、表9に示した様に、宿主と分泌生産されたアルカリセルラーゼの量を求めた。この結果、表9に示した様に、宿主として168PH sigA株又は168PF sigA株を用いた場合、対照の168株(野生型)の場合と比較して高いアルカリセルラーゼの分泌生産が認められた。一方、宿主として168PF sigAmを用いた場合のアルカリセルラーゼ分泌量は、対照の168株(野生型)と同等であったことから、168PH sigA株又は168PF sigA株に於ける高生産化が、ゲノム上に新たに付加されたsigH遺伝子或いはspolIIAオペロンのプロモーターを持つsigA遺伝子により、SigAが生産されたことによるものと推定された。

【0068】

【表8】

プライマー	塩基配列	配列番号
SigAf	ATGGCTGATAAACAACCCA	9
SigAr	CACCACAATGTTTCATTGCA	10
sigHuf	ACAGCCTTTCTTCCTCATTCT	11
sigHUr-sigA	CGTGGGTTTGTTTATCAGCCATTCCGATCCCCCGGCGCACG	12
sigFuf	GCTGATAGAACGTGACACGGG	13
sigFUr-sigA	CGTGGGTTTGTTTATCAGCCATGCTCATTCTCCTTGATATG	14
CmFW	CAACTAAAGCACCCATTAG	15
Cmr-sigA	CATTTGCAAAATGAACATTGTGGTGCTTCTTCAACTAACGGGGCA	16
sigAmf	ATAGCTGATAAACAACCCA	17
sigFUr-sigAm	CGTGGGTTTGTTTATCAGCTATGCTCATTCTCCTTGATATG	18

【0069】

【表 9】

宿主	アルカリセルラーゼ分泌生産量 (相対値)
168 (野生型)	100
168PHsigA	135
168PFsigA	146
168PFsigAm	108

【図面の簡単な説明】

【0070】

【図 1】 胞子形成過程における逐次的シグマ因子の活性化を示した模式図である。

【図 2】 本発明 sigA 遺伝子の構築例を示した概念図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KAO CORPORATION

<120> Mutant Bscillus

<130> P01080603

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 3.1

<210> 1

<211> 371

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 1

Met Ala Asp Lys Gln Thr His Glu Thr Glu Leu Thr Phe Asp Gln Val
1 5 10 15

Lys Glu Gln Leu Thr Glu Ser Gly Lys Lys Arg Gly Val Leu Thr Tyr
20 25 30

Glu Glu Ile Ala Glu Arg Met Ser Ser Phe Glu Ile Glu Ser Asp Gln
35 40 45

Met Asp Glu Tyr Tyr Glu Phe Leu Gly Glu Gln Gly Val Glu Leu Ile
50 55 60

Ser Glu Asn Glu Glu Thr Glu Asp Pro Asn Ile Gln Gln Leu Ala Lys
65 70 75 80

Ala Glu Glu Glu Phe Asp Leu Asn Asp Leu Ser Val Pro Pro Gly Val
85 90 95

Lys Ile Asn Asp Pro Val Arg Met Tyr Leu Lys Glu Ile Gly Arg Val
100 105 110

Asn Leu Leu Ser Ala Lys Glu Glu Ile Ala Tyr Ala Gln Lys Ile Glu

115 120 125

Glu Gly Asp Glu Glu Ser Lys Arg Arg Leu Ala Glu Ala Asn Leu Arg
130 135 140

Leu Val Val Ser Ile Ala Lys Arg Tyr Val Gly Arg Gly Met Leu Phe
145 150 155 160

Leu Asp Leu Ile His Glu Gly Asn Met Gly Leu Met Lys Ala Val Glu
165 170 175

Lys Phe Asp Tyr Arg Lys Gly Tyr Lys Phe Ser Thr Tyr Ala Thr Trp
180 185 190

Trp Ile Arg Gln Ala Ile Thr Arg Ala Ile Ala Asp Gln Ala Arg Thr
195 200 205

Ile Arg Ile Pro Val His Met Val Glu Thr Ile Asn Lys Leu Ile Arg
210 215 220

Val Gln Arg Gln Leu Leu Gln Asp Leu Gly Arg Glu Pro Thr Pro Glu
225 230 235 240

Glu Ile Ala Glu Asp Met Asp Leu Thr Pro Glu Lys Val Arg Glu Ile
245 250 255

Leu Lys Ile Ala Gln Glu Pro Val Ser Leu Glu Thr Pro Ile Gly Glu
260 265 270

Glu Asp Asp Ser His Leu Gly Asp Phe Ile Glu Asp Gln Glu Ala Thr
275 280 285

Ser Pro Ser Asp His Ala Ala Tyr Glu Leu Leu Lys Glu Gln Leu Glu
290 295 300

Asp Val Leu Asp Thr Leu Thr Asp Arg Glu Glu Asn Val Leu Arg Leu
305 310 315 320

Arg Phe Gly Leu Asp Asp Gly Arg Thr Arg Thr Leu Glu Glu Val Gly
 325 330 335

Lys Val Phe Gly Val Thr Arg Glu Arg Ile Arg Gln Ile Glu Ala Lys
 340 345 350

Ala Leu Arg Lys Leu Arg His Pro Ser Arg Ser Lys Arg Leu Lys Asp
 355 360 365

Phe Leu Glu
 370

<210> 2

<211> 1047

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 2

```

acagcctttc ttcctcattc tggacgagct tgaagaccct cataatcttg gttccattat      60
gaggacagca gatgcggtcg gcgctcatgg catcgtcatt ccaaacgga gagctgtcgg      120
gctgacaaca acagtggcaa aagcttcaac aggagcaatt gagcacattc ctgtagcaag      180
agtcaccaat ttggcacgga cgttagaaga gatgaaagag cggggaatct gggttgtcgg      240
aacggatgcg tccgcgcgtg aggatttccg taatatggac ggcaatatgc ctttggctct      300
agtcacgga agtgaaggaa aagggatggg ccgccttgtg aaggaaaagt gcgattttct      360
cattaaactc ccgatggccg gaaaggtaac ttcactaaat gcatctgtcg cggctggtct      420
tttgatgtat gaagtctacc ggaaacgaaa ccctgtggga gaataaagac ccatggatat      480
cctgttagta gacgggtaca acatgattgg agcctggccg cagctgaagg atttaaaagc      540
gaacagtttt gaagaggcga gagacgtact gattcagaaa atggcggaat atcaatcgta      600
tacaggaaac agggttattg ttgtttttga cgcgcatctc gtaaaagggc ttgagaaaaa      660
acagaccaac catagagttg aagtaatatt taaaaagaa aatgagacgg ctgatgagcg      720
gatagaaaag ctcgctcagg ctttgaataa tattgcgact caaatcacg ttgcgacctc      780
tgactatact gagcagtggg cgattttcgg acagggggca ttgcggaaat cggcccggga      840

```

gcttctgaga gaggtagaaa cgattgaaag gcgaatagag agacgggtaa gaaaaatcac 900
ttccgaaaag ccggcgggta aaattgcttt atcggaagag gttttgaaaa cgtttgaaaa 960
gtggaggcgg ggagacttag attaagtiga cgcttttttg cccaatactg tataatatit 1020
ctatctacgt gcgccggggg gatcgga 1047

<210> 3
<211> 1143
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis

<400> 3
gctgatagaa cgtgacacgg gaaaagtgct ttacaacaag aacagcaatg agagactggc 60
gcctgcaagc atgacgaaaa ttatgacgat gcttttgatt atggaagcct tagataaagg 120
caaaatcaaa atgagtgata aggtccgtac aagcgagcat gcggcgtcaa tgggcggctc 180
acagatattc cttagcccg gcgaagaaat gactgtcaaa gaaatgctga aaggcatcgc 240
aatcgcttcg ggaaatgacg ctccgctgc catggctgaa tttatttccg gctctgaaga 300
agaatttgatg aagaaaatga ataaaaaagc aaaagagctg ggattgaaaa atacatcctt 360
taaaaacca acaggactga ccgaggaagg aactacagc tctgcttatg acatggcaat 420
catggctaag gaattattga aatacgaatc aattacgaag ttaccggca cgtatgaaga 480
ttatctgcgt gaaaatacag ataaaaagtt ttggcttgta aatacaaatc gccttatcaa 540
attttatcct ggtgtagacg gcgtaaaaac aggctataca ggcaagcga aatattgtct 600
gactgcttcg gctaaaaaag gaaacatgcg ggccatagcg gttgtattcg gagcgagcac 660
gcctaaagaa agaaacgcgc aagtgacaaa aatgcttgac ttcgccttta gccaatatga 720
aacgcacctt ttatataaac gaaatcaaac agtagcaaaa gtaaaggta aaaaaggga 780
acaaaaatit atcgaactca ctacatctga gccgatttca atattgacga aaaaaggcga 840
ggatatgaac gatgtgaaaa aagaaatcaa gatgaaggac aatattagt ctccgattca 900
aaaaggccaa gagcttggca ctcttgctt gaaaaaggat ggagaagtac tcgctgaaag 960
tcctgttgct gcaaaagaag atatgaagaa agccgggttt atcacattct taaagcggac 1020

gatgggagac tggacaaaat ttaagtaatt atgccgaatg accactagtt ttgtcacggt 1080
 gaaggaattc attccgtcga aatcgaaaca ctcattatcc gatcatatca aggaggaatg 1140
 agc 1143

<210> 4
 <211> 795
 <212> PRT
 <213> Bacillus sp. KSM-S237

<400> 4

Ala Glu Gly Asn Thr Arg Glu Asp Asn Phe Lys His Leu Leu Gly Asn
 1 5 10 15

Asp Asn Val Lys Arg Pro Ser Glu Ala Gly Ala Leu Gln Leu Gln Glu
 20 25 30

Val Asp Gly Gln Met Thr Leu Val Asp Gln His Gly Glu Lys Ile Gln
 35 40 45

Leu Arg Gly Met Ser Thr His Gly Leu Gln Trp Phe Pro Glu Ile Leu
 50 55 60

Asn Asp Asn Ala Tyr Lys Ala Leu Ser Asn Asp Trp Asp Ser Asn Met
 65 70 75 80

Ile Arg Leu Ala Met Tyr Val Gly Glu Asn Gly Tyr Ala Thr Asn Pro
 85 90 95

Glu Leu Ile Lys Gln Arg Val Ile Asp Gly Ile Glu Leu Ala Ile Glu
 100 105 110

Asn Asp Met Tyr Val Ile Val Asp Trp His Val His Ala Pro Gly Asp
 115 120 125

Pro Arg Asp Pro Val Tyr Ala Gly Ala Lys Asp Phe Phe Arg Glu Ile
 130 135 140

Ala Ala Leu Tyr Pro Asn Asn Pro His Ile Ile Tyr Glu Leu Ala Asn
145 150 155 160

Glu Pro Ser Ser Asn Asn Asn Gly Gly Ala Gly Ile Pro Asn Asn Glu
165 170 175

Glu Gly Trp Lys Ala Val Lys Glu Tyr Ala Asp Pro Ile Val Glu Met
180 185 190

Leu Arg Lys Ser Gly Asn Ala Asp Asp Asn Ile Ile Ile Val Gly Ser
195 200 205

Pro Asn Trp Ser Gln Arg Pro Asp Leu Ala Ala Asp Asn Pro Ile Asp
210 215 220

Asp His His Thr Met Tyr Thr Val His Phe Tyr Thr Gly Ser His Ala
225 230 235 240

Ala Ser Thr Glu Ser Tyr Pro Ser Glu Thr Pro Asn Ser Glu Arg Gly
245 250 255

Asn Val Met Ser Asn Thr Arg Tyr Ala Leu Glu Asn Gly Val Ala Val
260 265 270

Phe Ala Thr Glu Trp Gly Thr Ser Gln Ala Ser Gly Asp Gly Gly Pro
275 280 285

Tyr Phe Asp Glu Ala Asp Val Trp Ile Glu Phe Leu Asn Glu Asn Asn
290 295 300

Ile Ser Trp Ala Asn Trp Ser Leu Thr Asn Lys Asn Glu Val Ser Gly
305 310 315 320

Ala Phe Thr Pro Phe Glu Leu Gly Lys Ser Asn Ala Thr Asn Leu Asp
325 330 335

Pro Gly Pro Asp His Val Trp Ala Pro Glu Glu Leu Ser Leu Ser Gly
340 345 350

Glu Tyr Val Arg Ala Arg Ile Lys Gly Val Asn Tyr Glu Pro Ile Asp
355 360 365

Arg Thr Lys Tyr Thr Lys Val Leu Trp Asp Phe Asn Asp Gly Thr Lys
370 375 380

Gln Gly Phe Gly Val Asn Ser Asp Ser Pro Asn Lys Glu Leu Ile Ala
385 390 395 400

Val Asp Asn Glu Asn Asn Thr Leu Lys Val Ser Gly Leu Asp Val Ser
405 410 415

Asn Asp Val Ser Asp Gly Asn Phe Trp Ala Asn Ala Arg Leu Ser Ala
420 425 430

Asn Gly Trp Gly Lys Ser Val Asp Ile Leu Gly Ala Glu Lys Leu Thr
435 440 445

Met Asp Val Ile Val Asp Glu Pro Thr Thr Val Ala Ile Ala Ala Ile
450 455 460

Pro Gln Ser Ser Lys Ser Gly Trp Ala Asn Pro Glu Arg Ala Val Arg
465 470 475 480

Val Asn Ala Glu Asp Phe Val Gln Gln Thr Asp Gly Lys Tyr Lys Ala
485 490 495

Gly Leu Thr Ile Thr Gly Glu Asp Ala Pro Asn Leu Lys Asn Ile Ala
500 505 510

Phe His Glu Glu Asp Asn Asn Met Asn Asn Ile Ile Leu Phe Val Gly
515 520 525

Thr Asp Ala Ala Asp Val Ile Tyr Leu Asp Asn Ile Lys Val Ile Gly
530 535 540

Thr Glu Val Glu Ile Pro Val Val His Asp Pro Lys Gly Glu Ala Val
545 550 555 560

Leu Pro Ser Val Phe Glu Asp Gly Thr Arg Gln Gly Trp Asp Trp Ala
565 570 575

Gly Glu Ser Gly Val Lys Thr Ala Leu Thr Ile Glu Glu Ala Asn Gly
580 585 590

Ser Asn Ala Leu Ser Trp Glu Phe Gly Tyr Pro Glu Val Lys Pro Ser
595 600 605

Asp Asn Trp Ala Thr Ala Pro Arg Leu Asp Phe Trp Lys Ser Asp Leu
610 615 620

Val Arg Gly Glu Asn Asp Tyr Val Ala Phe Asp Phe Tyr Leu Asp Pro
625 630 635 640

Val Arg Ala Thr Glu Gly Ala Met Asn Ile Asn Leu Val Phe Gln Pro
645 650 655

Pro Thr Asn Gly Tyr Trp Val Gln Ala Pro Lys Thr Tyr Thr Ile Asn
660 665 670

Phe Asp Glu Leu Glu Glu Ala Asn Gln Val Asn Gly Leu Tyr His Tyr
675 680 685

Glu Val Lys Ile Asn Val Arg Asp Ile Thr Asn Ile Gln Asp Asp Thr
690 695 700

Leu Leu Arg Asn Met Met Ile Ile Phe Ala Asp Val Glu Ser Asp Phe
705 710 715 720

Ala Gly Arg Val Phe Val Asp Asn Val Arg Phe Glu Gly Ala Ala Thr
725 730 735

Thr Glu Pro Val Glu Pro Glu Pro Val Asp Pro Gly Glu Glu Thr Pro
740 745 750

Pro Val Asp Glu Lys Glu Ala Lys Lys Glu Gln Lys Glu Ala Glu Lys
 755 760 765

Glu Glu Lys Glu Ala Val Lys Glu Glu Lys Lys Glu Ala Lys Glu Glu
 770 775 780

Lys Lys Ala Val Lys Asn Glu Ala Lys Lys Lys
 785 790 795

<210> 5
 <211> 3150
 <212> DNA
 <213> Bacillus sp. KSM-S237

<220>
 <221> CDS
 <222> (573)..(3044)
 <223>

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (573)..(659)
 <223>

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (660)..(3044)
 <223>

<400> 5
 gatttgccga tgcaacaggc ttatatattag aggaaatttc tttttaaatt gaatacggaa 60
 taaaatcagg taaacaggtc ctgattttat ttttttagagt ttttttagaga actgaagatt 120
 gaaataaaag tagaagacaa aggacataag aaaattgcat tagttttaat tatagaaaac 180
 gcctttttat aattattttat acctagaacg aaaataactgt ttcgaaagcg gtttactata 240
 aaaccttata ttccggctct tttttaaaac aggggggtaaa aattcactct agtattctaa 300
 tttcaacatg ctataataaa tttgtaagac gcaatatgca tctctttttt tacgatatat 360
 gtaagcgggtt aaccttgtgc tatatgccga tttaggaagg ggggtagatt gagtcaagta 420
 gtaataatat agataactta taagttgttg agaagcagga gagcatctgg gttactcaca 480

agttttttta aaactttaac gaaagcactt tcggtaatgc ttatgaattt agctatttga 540
 ttcaattact ttaaaaatat ttaggaggta at atg atg tta aga aag aaa aca 593
 Met Met Leu Arg Lys Lys Thr
 -25
 aag cag ttg att tct tcc att ctt att tta gtt tta ctt cta tct tta 641
 Lys Gln Leu Ile Ser Ser Ile Leu Ile Leu Val Leu Leu Leu Ser Leu
 -20 -15 -10
 ttt ccg gca gct ctt gca gca gaa gga aac act cgt gaa gac aat ttt 689
 Phe Pro Ala Ala Leu Ala Ala Glu Gly Asn Thr Arg Glu Asp Asn Phe
 -5 -1 1 5 10
 aaa cat tta tta ggt aat gac aat gtt aaa cgc cct tct gag gct ggc 737
 Lys His Leu Leu Gly Asn Asp Asn Val Lys Arg Pro Ser Glu Ala Gly
 15 20 25
 gca tta caa tta caa gaa gtc gat gga caa atg aca tta gta gat caa 785
 Ala Leu Gln Leu Gln Glu Val Asp Gly Gln Met Thr Leu Val Asp Gln
 30 35 40
 cat gga gaa aaa att caa tta cgt gga atg agt aca cac gga tta cag 833
 His Gly Glu Lys Ile Gln Leu Arg Gly Met Ser Thr His Gly Leu Gln
 45 50 55
 tgg ttt cct gag atc ttg aat gat aac gca tac aaa gct ctt tct aac 881
 Trp Phe Pro Glu Ile Leu Asn Asp Asn Ala Tyr Lys Ala Leu Ser Asn
 60 65 70
 gat tgg gat tcc aat atg att cgt ctt gct atg tat gta ggt gaa aat 929
 Asp Trp Asp Ser Asn Met Ile Arg Leu Ala Met Tyr Val Gly Glu Asn
 75 80 85 90
 ggg tac gct aca aac cct gag tta atc aaa caa aga gtg att gat gga 977
 Gly Tyr Ala Thr Asn Pro Glu Leu Ile Lys Gln Arg Val Ile Asp Gly
 95 100 105
 att gag tta gcg att gaa aat gac atg tat gtt att gtt gac tgg cat 1025
 Ile Glu Leu Ala Ile Glu Asn Asp Met Tyr Val Ile Val Asp Trp His
 110 115 120
 gtt cat gcg cca ggt gat cct aga gat cct gtt tat gca ggt gct aaa 1073
 Val His Ala Pro Gly Asp Pro Arg Asp Pro Val Tyr Ala Gly Ala Lys
 125 130 135
 gat ttc ttt aga gaa att gca gct tta tac cct aat aat cca cac att 1121
 Asp Phe Phe Arg Glu Ile Ala Ala Leu Tyr Pro Asn Asn Pro His Ile
 140 145 150

att tat gag tta gcg aat gag ccg agt agt aat aat aat ggt gga gca Ile Tyr Glu Leu Ala Asn Glu Pro Ser Ser Asn Asn Asn Gly Gly Ala 155 160 165 170	1169
ggg att ccg aat aac gaa gaa ggt tgg aaa gcg gta aaa gaa tat gct Gly Ile Pro Asn Asn Glu Glu Gly Trp Lys Ala Val Lys Glu Tyr Ala 175 180 185	1217
gat cca att gta gaa atg tta cgt aaa agc ggt aat gca gat gac aac Asp Pro Ile Val Glu Met Leu Arg Lys Ser Gly Asn Ala Asp Asp Asn 190 195 200	1265
att atc att gtt ggt agt cca aac tgg agt cag cgt ccg gac tta gca Ile Ile Ile Val Gly Ser Pro Asn Trp Ser Gln Arg Pro Asp Leu Ala 205 210 215	1313
gct gat aat cca att gat gat cac cat aca atg tat act gtt cac ttc Ala Asp Asn Pro Ile Asp Asp His His Thr Met Tyr Thr Val His Phe 220 225 230	1361
tac act ggt tca cat gct gct tca act gaa agc tat ccg tct gaa act Tyr Thr Gly Ser His Ala Ala Ser Thr Glu Ser Tyr Pro Ser Glu Thr 235 240 245 250	1409
cct aac tct gaa aga gga aac gta atg agt aac act cgt tat gcg tta Pro Asn Ser Glu Arg Gly Asn Val Met Ser Asn Thr Arg Tyr Ala Leu 255 260 265	1457
gaa aac gga gta gcg gta ttt gca aca gag tgg gga acg agt caa gct Glu Asn Gly Val Ala Val Phe Ala Thr Glu Trp Gly Thr Ser Gln Ala 270 275 280	1505
agt gga gac ggt ggt cct tac ttt gat gaa gca gat gta tgg att gaa Ser Gly Asp Gly Gly Pro Tyr Phe Asp Glu Ala Asp Val Trp Ile Glu 285 290 295	1553
ttt tta aat gaa aac aac att agc tgg gct aac tgg tct tta acg aat Phe Leu Asn Glu Asn Asn Ile Ser Trp Ala Asn Trp Ser Leu Thr Asn 300 305 310	1601
aaa aat gaa gta tct ggt gca ttt aca cca ttc gag tta ggt aag tct Lys Asn Glu Val Ser Gly Ala Phe Thr Pro Phe Glu Leu Gly Lys Ser 315 320 325 330	1649
aac gca acc aat ctt gac cca ggt cca gat cat gtg tgg gca cca gaa Asn Ala Thr Asn Leu Asp Pro Gly Pro Asp His Val Trp Ala Pro Glu 335 340 345	1697
gaa tta agt ctt tct gga gaa tat gta cgt gct cgt att aaa ggt gtg	1745

Glu Leu Ser Leu Ser Gly Glu Tyr Val Arg Ala Arg Ile Lys Gly Val	
350 355 360	
aac tat gag cca atc gac cgt aca aaa tac acg aaa gta ctt tgg gac	1793
Asn Tyr Glu Pro Ile Asp Arg Thr Lys Tyr Thr Lys Val Leu Trp Asp	
365 370 375	
ttt aat gat gga acg aag caa gga ttt gga gtg aat tcg gat tct cca	1841
Phe Asn Asp Gly Thr Lys Gln Gly Phe Gly Val Asn Ser Asp Ser Pro	
380 385 390	
aat aaa gaa ctt att gca gtt gat aat gaa aac aac act ttg aaa gtt	1889
Asn Lys Glu Leu Ile Ala Val Asp Asn Glu Asn Asn Thr Leu Lys Val	
395 400 405 410	
tcg gga tta gat gta agt aac gat gtt tca gat ggc aac ttc tgg gct	1937
Ser Gly Leu Asp Val Ser Asn Asp Val Ser Asp Gly Asn Phe Trp Ala	
415 420 425	
aat gct cgt ctt tct gcc aac ggt tgg gga aaa agt gtt gat att tta	1985
Asn Ala Arg Leu Ser Ala Asn Gly Trp Gly Lys Ser Val Asp Ile Leu	
430 435 440	
ggt gct gag aag ctt aca atg gat gtt att gtt gat gaa cca acg acg	2033
Gly Ala Glu Lys Leu Thr Met Asp Val Ile Val Asp Glu Pro Thr Thr	
445 450 455	
gta gct att gcg gcg att cca caa agt agt aaa agt gga tgg gca aat	2081
Val Ala Ile Ala Ala Ile Pro Gln Ser Ser Lys Ser Gly Trp Ala Asn	
460 465 470	
cca gag cgt gct gtt cga gtg aac gcg gaa gat ttt gtc cag caa acg	2129
Pro Glu Arg Ala Val Arg Val Asn Ala Glu Asp Phe Val Gln Gln Thr	
475 480 485 490	
gac ggt aag tat aaa gct gga tta aca att aca gga gaa gat gct cct	2177
Asp Gly Lys Tyr Lys Ala Gly Leu Thr Ile Thr Gly Glu Asp Ala Pro	
495 500 505	
aac cta aaa aat atc gct ttt cat gaa gaa gat aac aat atg aac aac	2225
Asn Leu Lys Asn Ile Ala Phe His Glu Glu Asp Asn Asn Met Asn Asn	
510 515 520	
atc att ctg ttc gtg gga act gat gca gct gac gtt att tac tta gat	2273
Ile Ile Leu Phe Val Gly Thr Asp Ala Ala Asp Val Ile Tyr Leu Asp	
525 530 535	
aac att aaa gta att gga aca gaa gtt gaa att cca gtt gtt cat gat	2321
Asn Ile Lys Val Ile Gly Thr Glu Val Glu Ile Pro Val Val His Asp	
540 545 550	

cca aaa gga gaa gct gtt ctt cct tct gtt ttt gaa gac ggt aca cgt Pro Lys Gly Glu Ala Val Leu Pro Ser Val Phe Glu Asp Gly Thr Arg 555 560 565 570	2369
caa ggt tgg gac tgg gct gga gag tct ggt gtg aaa aca gct tta aca Gln Gly Trp Asp Trp Ala Gly Glu Ser Gly Val Lys Thr Ala Leu Thr 575 580 585	2417
att gaa gaa gca aac ggt tct aac gcg tta tca tgg gaa ttt gga tat Ile Glu Glu Ala Asn Gly Ser Asn Ala Leu Ser Trp Glu Phe Gly Tyr 590 595 600	2465
cca gaa gta aaa cct agt gat aac tgg gca aca gct cca cgt tta gat Pro Glu Val Lys Pro Ser Asp Asn Trp Ala Thr Ala Pro Arg Leu Asp 605 610 615	2513
ttc tgg aaa tct gac ttg gtt cgc ggt gag aat gat tat gta gct ttt Phe Trp Lys Ser Asp Leu Val Arg Gly Glu Asn Asp Tyr Val Ala Phe 620 625 630	2561
gat ttc tat cta gat cca gtt cgt gca aca gaa ggc gca atg aat atc Asp Phe Tyr Leu Asp Pro Val Arg Ala Thr Glu Gly Ala Met Asn Ile 635 640 645 650	2609
aat tta gta ttc cag cca cct act aac ggg tat tgg gta caa gca cca Asn Leu Val Phe Gln Pro Pro Thr Asn Gly Tyr Trp Val Gln Ala Pro 655 660 665	2657
aaa acg tat acg att aac ttt gat gaa tta gag gaa gcg aat caa gta Lys Thr Tyr Thr Ile Asn Phe Asp Glu Leu Glu Glu Ala Asn Gln Val 670 675 680	2705
aat ggt tta tat cac tat gaa gtg aaa att aac gta aga gat att aca Asn Gly Leu Tyr His Tyr Glu Val Lys Ile Asn Val Arg Asp Ile Thr 685 690 695	2753
aac att caa gat gac acg tta cta cgt aac atg atg atc att ttt gca Asn Ile Gln Asp Asp Thr Leu Leu Arg Asn Met Met Ile Ile Phe Ala 700 705 710	2801
gat gta gaa agt gac ttt gca ggg aga gtc ttt gta gat aat gtt cgt Asp Val Glu Ser Asp Phe Ala Gly Arg Val Phe Val Asp Asn Val Arg 715 720 725 730	2849
ttt gag ggg gct gct act act gag ccg gtt gaa cca gag cca gtt gat Phe Glu Gly Ala Ala Thr Thr Glu Pro Val Glu Pro Glu Pro Val Asp 735 740 745	2897
cct ggc gaa gag acg cca cct gtc gat gag aag gaa gcg aaa aaa gaa	2945

Pro Gly Glu Glu Thr Pro Pro Val Asp Glu Lys Glu Ala Lys Lys Glu
 750 755 760

caa aaa gaa gca gag aaa gaa gag aaa gaa gca gta aaa gaa gaa aag 2993
 Gln Lys Glu Ala Glu Lys Glu Glu Lys Glu Ala Val Lys Glu Glu Lys
 765 770 775

aaa gaa gct aaa gaa gaa aag aaa gca gtc aaa aat gag gct aag aaa 3041
 Lys Glu Ala Lys Glu Glu Lys Lys Ala Val Lys Asn Glu Ala Lys Lys
 780 785 790

aaa taatctatta aactagttat agggttatct aaaggtctga tgtagatctt 3094
 Lys
 795

ttagataacc tttttcttgc ataactggac acagagttgt tattaaagaa agtaag 3150

<210> 6

<211> 793

<212> PRT

<213> Bacillus sp. KSM-64

<400> 6

Ala Glu Gly Asn Thr Arg Glu Asp Asn Phe Lys His Leu Leu Gly Asn
 1 5 10 15

Asp Asn Val Lys Arg Pro Ser Glu Ala Gly Ala Leu Gln Leu Gln Glu
 20 25 30

Val Asp Gly Gln Met Thr Leu Val Asp Gln His Gly Glu Lys Ile Gln
 35 40 45

Leu Arg Gly Met Ser Thr His Gly Leu Gln Trp Phe Pro Glu Ile Leu
 50 55 60

Asn Asp Asn Ala Tyr Lys Ala Leu Ala Asn Asp Trp Glu Ser Asn Met
 65 70 75 80

Ile Arg Leu Ala Met Tyr Val Gly Glu Asn Gly Tyr Ala Ser Asn Pro
 85 90 95

Glu Leu Ile Lys Ser Arg Val Ile Lys Gly Ile Asp Leu Ala Ile Glu

100

105

110

Asn Asp Met Tyr Val Ile Val Asp Trp His Val His Ala Pro Gly Asp
115 120 125

Pro Arg Asp Pro Val Tyr Ala Gly Ala Glu Asp Phe Phe Arg Asp Ile
130 135 140

Ala Ala Leu Tyr Pro Asn Asn Pro His Ile Ile Tyr Glu Leu Ala Asn
145 150 155 160

Glu Pro Ser Ser Asn Asn Asn Gly Gly Ala Gly Ile Pro Asn Asn Glu
165 170 175

Glu Gly Trp Asn Ala Val Lys Glu Tyr Ala Asp Pro Ile Val Glu Met
180 185 190

Leu Arg Asp Ser Gly Asn Ala Asp Asp Asn Ile Ile Ile Val Gly Ser
195 200 205

Pro Asn Trp Ser Gln Arg Pro Asp Leu Ala Ala Asp Asn Pro Ile Asp
210 215 220

Asp His His Thr Met Tyr Thr Val His Phe Tyr Thr Gly Ser His Ala
225 230 235 240

Ala Ser Thr Glu Ser Tyr Pro Pro Glu Thr Pro Asn Ser Glu Arg Gly
245 250 255

Asn Val Met Ser Asn Thr Arg Tyr Ala Leu Glu Asn Gly Val Ala Val
260 265 270

Phe Ala Thr Glu Trp Gly Thr Ser Gln Ala Asn Gly Asp Gly Gly Pro
275 280 285

Tyr Phe Asp Glu Ala Asp Val Trp Ile Glu Phe Leu Asn Glu Asn Asn
290 295 300

Ile Ser Trp Ala Asn Trp Ser Leu Thr Asn Lys Asn Glu Val Ser Gly
305 310 315 320

Ala Phe Thr Pro Phe Glu Leu Gly Lys Ser Asn Ala Thr Ser Leu Asp
325 330 335

Pro Gly Pro Asp Gln Val Trp Val Pro Glu Glu Leu Ser Leu Ser Gly
340 345 350

Glu Tyr Val Arg Ala Arg Ile Lys Gly Val Asn Tyr Glu Pro Ile Asp
355 360 365

Arg Thr Lys Tyr Thr Lys Val Leu Trp Asp Phe Asn Asp Gly Thr Lys
370 375 380

Gln Gly Phe Gly Val Asn Gly Asp Ser Pro Val Glu Asp Val Val Ile
385 390 395 400

Glu Asn Glu Ala Gly Ala Leu Lys Leu Ser Gly Leu Asp Ala Ser Asn
405 410 415

Asp Val Ser Glu Gly Asn Tyr Trp Ala Asn Ala Arg Leu Ser Ala Asp
420 425 430

Gly Trp Gly Lys Ser Val Asp Ile Leu Gly Ala Glu Lys Leu Thr Met
435 440 445

Asp Val Ile Val Asp Glu Pro Thr Thr Val Ser Ile Ala Ala Ile Pro
450 455 460

Gln Gly Pro Ser Ala Asn Trp Val Asn Pro Asn Arg Ala Ile Lys Val
465 470 475 480

Glu Pro Thr Asn Phe Val Pro Leu Gly Asp Lys Phe Lys Ala Glu Leu
485 490 495

Thr Ile Thr Ser Ala Asp Ser Pro Ser Leu Glu Ala Ile Ala Met His

500

505

510

Ala Glu Asn Asn Asn Ile Asn Asn Ile Ile Leu Phe Val Gly Thr Glu
 515 520 525

Gly Ala Asp Val Ile Tyr Leu Asp Asn Ile Lys Val Ile Gly Thr Glu
 530 535 540

Val Glu Ile Pro Val Val His Asp Pro Lys Gly Glu Ala Val Leu Pro
 545 550 555 560

Ser Val Phe Glu Asp Gly Thr Arg Gln Gly Trp Asp Trp Ala Gly Glu
 565 570 575

Ser Gly Val Lys Thr Ala Leu Thr Ile Glu Glu Ala Asn Gly Ser Asn
 580 585 590

Ala Leu Ser Trp Glu Phe Gly Tyr Pro Glu Val Lys Pro Ser Asp Asn
 595 600 605

Trp Ala Thr Ala Pro Arg Leu Asp Phe Trp Lys Ser Asp Leu Val Arg
 610 615 620

Gly Glu Asn Asp Tyr Val Thr Phe Asp Phe Tyr Leu Asp Pro Val Arg
 625 630 635 640

Ala Thr Glu Gly Ala Met Asn Ile Asn Leu Val Phe Gln Pro Pro Thr
 645 650 655

Asn Gly Tyr Trp Val Gln Ala Pro Lys Thr Tyr Thr Ile Asn Phe Asp
 660 665 670

Glu Leu Glu Glu Ala Asn Gln Val Asn Gly Leu Tyr His Tyr Glu Val
 675 680 685

Lys Ile Asn Val Arg Asp Ile Thr Asn Ile Gln Asp Asp Thr Leu Leu
 690 695 700

Arg Asn Met Met Ile Ile Phe Ala Asp Val Glu Ser Asp Phe Ala Gly
705 710 715 720

Arg Val Phe Val Asp Asn Val Arg Phe Glu Gly Ala Ala Thr Thr Glu
725 730 735

Pro Val Glu Pro Glu Pro Val Asp Pro Gly Glu Glu Thr Pro Pro Val
740 745 750

Asp Glu Lys Glu Ala Lys Lys Glu Gln Lys Glu Ala Glu Lys Glu Glu
755 760 765

Lys Glu Ala Val Lys Glu Glu Lys Lys Glu Ala Lys Glu Glu Lys Lys
770 775 780

Ala Ile Lys Asn Glu Ala Thr Lys Lys
785 790

<210> 7
<211> 3332
<212> DNA
<213> Bacillus sp. KSM-64

<220>
<221> CDS
<222> (610)..(3075)
<223>

<220>
<221> sig_peptide
<222> (610)..(696)
<223>

<220>
<221> mat_peptide
<222> (697)..(3075)
<223>

<400> 7
agtacttacc atttttagagt caaaagatag aagccaagca ggatttgccg atgcaaccgg 60
cittatattta gaggggaattt cttttttaaat tgaatacggg ataaaatcag gtaaacaggt 120

cctgatttta tttttttgaa tttttttgag aactaaagat tgaaatagaa gtagaagaca 180
 acggacataa gaaaattgta ttagtittta ttatagaaaa cgcttttcta taattattta 240
 tacctagaac gaaaatactg tttcgaaagc gggtttactat aaaaccttat attccggctc 300
 tttttttaaa caggggggtga aaattcactc tagtattcta atttcaacat gctataataa 360
 atttgtaaga cgcaatatac atcttttttt tatgatattt gtaagcggtt aaccttgtgc 420
 tatatgccga ttttaggaagg gggtagattg agtcaagtag tcataattta gataacttat 480
 aagttgttga gaagcaggag agaattctggg ttactcacia gttttttaaa acattatcga 540
 aagcacitc gggttatgctt atgaatttag ctatttgatt caattacttt aataatttta 600
 ggaggtaat atg atg tta aga aag aaa aca aag cag ttg att tct tcc att 651
 Met Met Leu Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ile Ser Ser Ile
 -25 -20
 ctt att tta gtt tta ctt cta tct tta ttt ccg aca gct ctt gca gca 699
 Leu Ile Leu Val Leu Leu Leu Ser Leu Phe Pro Thr Ala Leu Ala Ala
 -15 -10 -5 -1 1
 gaa gga aac act cgt gaa gac aat ttt aaa cat tta tta ggt aat gac 747
 Glu Gly Asn Thr Arg Glu Asp Asn Phe Lys His Leu Leu Gly Asn Asp
 5 10 15
 aat gtt aaa cgc cct tct gag gct ggc gca tta caa tta caa gaa gtc 795
 Asn Val Lys Arg Pro Ser Glu Ala Gly Ala Leu Gln Leu Gln Glu Val
 20 25 30
 gat gga caa atg aca tta gta gat caa cat gga gaa aaa att caa tta 843
 Asp Gly Gln Met Thr Leu Val Asp Gln His Gly Glu Lys Ile Gln Leu
 35 40 45
 cgt gga atg agt aca cac gga tta caa tgg ttt cct gag atc ttg aat 891
 Arg Gly Met Ser Thr His Gly Leu Gln Trp Phe Pro Glu Ile Leu Asn
 50 55 60 65
 gat aac gca tac aaa gct ctt gct aac gat tgg gaa tca aat atg att 939
 Asp Asn Ala Tyr Lys Ala Leu Ala Asn Asp Trp Glu Ser Asn Met Ile
 70 75 80
 cgt cta gct atg tat gtc ggt gaa aat ggc tat gct tca aat cca gag 987
 Arg Leu Ala Met Tyr Val Gly Glu Asn Gly Tyr Ala Ser Asn Pro Glu
 85 90 95
 tta att aaa agc aga gtc att aaa gga ata gat ctt gct att gaa aat 1035
 Leu Ile Lys Ser Arg Val Ile Lys Gly Ile Asp Leu Ala Ile Glu Asn

100	105	110	
gac atg tat gtc atc gtt gat tgg cat gta cat gca cct ggt gat cct			1083
Asp Met Tyr Val Ile Val Asp Trp His Val His Ala Pro Gly Asp Pro			
115	120	125	
aga gat ccc gtt tac gct gga gca gaa gat ttc ttt aga gat att gca			1131
Arg Asp Pro Val Tyr Ala Gly Ala Glu Asp Phe Phe Arg Asp Ile Ala			
130	135	140	145
gca tta tat cct aac aat cca cac att att tat gag tta gcg aat gag			1179
Ala Leu Tyr Pro Asn Asn Pro His Ile Ile Tyr Glu Leu Ala Asn Glu			
150	155	160	
cca agt agt aac aat aat ggt gga gct ggg att cca aat aat gaa gaa			1227
Pro Ser Ser Asn Asn Asn Gly Gly Ala Gly Ile Pro Asn Asn Glu Glu			
165	170	175	
ggt tgg aat gcg gta aaa gaa tac gct gat cca att gta gaa atg tta			1275
Gly Trp Asn Ala Val Lys Glu Tyr Ala Asp Pro Ile Val Glu Met Leu			
180	185	190	
cgt gat agc ggg aac gca gat gac aat att atc att gtg ggt agt cca			1323
Arg Asp Ser Gly Asn Ala Asp Asp Asn Ile Ile Ile Val Gly Ser Pro			
195	200	205	
aac tgg agt cag cgt cct gac tta gca gct gat aat cca att gat gat			1371
Asn Trp Ser Gln Arg Pro Asp Leu Ala Ala Asp Asn Pro Ile Asp Asp			
210	215	220	225
cac cat aca atg tat act gtt cac ttc tac act ggt tca cat gct gct			1419
His His Thr Met Tyr Thr Val His Phe Tyr Thr Gly Ser His Ala Ala			
230	235	240	
tca act gaa agc tat ccg cct gaa act cct aac tct gaa aga gga aac			1467
Ser Thr Glu Ser Tyr Pro Pro Glu Thr Pro Asn Ser Glu Arg Gly Asn			
245	250	255	
gta atg agt aac act cgt tat gcg tta gaa aac gga gta gca gta ttt			1515
Val Met Ser Asn Thr Arg Tyr Ala Leu Glu Asn Gly Val Ala Val Phe			
260	265	270	
gca aca gag tgg gga act agc caa gca aat gga gat ggt ggt cct tac			1563
Ala Thr Glu Trp Gly Thr Ser Gln Ala Asn Gly Asp Gly Gly Pro Tyr			
275	280	285	
ttt gat gaa gca gat gta tgg att gag ttt tta aat gaa aac aac att			1611
Phe Asp Glu Ala Asp Val Trp Ile Glu Phe Leu Asn Glu Asn Asn Ile			
290	295	300	305

agc tgg gct aac tgg tct tta acg aat aaa aat gaa gta tct ggt gca	1659
Ser Trp Ala Asn Trp Ser Leu Thr Asn Lys Asn Glu Val Ser Gly Ala	
310 315 320	
ttt aca cca ttc gag tta ggt aag tct aac gca aca agt ctt gac cca	1707
Phe Thr Pro Phe Glu Leu Gly Lys Ser Asn Ala Thr Ser Leu Asp Pro	
325 330 335	
ggg cca gac caa gta tgg gta cca gaa gag tta agt ctt tct gga gaa	1755
Gly Pro Asp Gln Val Trp Val Pro Glu Glu Leu Ser Leu Ser Gly Glu	
340 345 350	
tat gta cgt gct cgt att aaa ggt gtg aac tat gag cca atc gac cgt	1803
Tyr Val Arg Ala Arg Ile Lys Gly Val Asn Tyr Glu Pro Ile Asp Arg	
355 360 365	
aca aaa tac acg aaa gta ctt tgg gac ttt aat gat gga acg aag caa	1851
Thr Lys Tyr Thr Lys Val Leu Trp Asp Phe Asn Asp Gly Thr Lys Gln	
370 375 380 385	
gga ttt gga gtg aat gga gat tct cca gtt gaa gat gta gtt att gag	1899
Gly Phe Gly Val Asn Gly Asp Ser Pro Val Glu Asp Val Val Ile Glu	
390 395 400	
aat gaa gcg ggc gct tta aaa ctt tca gga tta gat gca agt aat gat	1947
Asn Glu Ala Gly Ala Leu Lys Leu Ser Gly Leu Asp Ala Ser Asn Asp	
405 410 415	
gtt tct gaa ggt aat tac tgg gct aat gct cgt ctt tct gcc gac ggt	1995
Val Ser Glu Gly Asn Tyr Trp Ala Asn Ala Arg Leu Ser Ala Asp Gly	
420 425 430	
tgg gga aaa agt gtt gat att tta ggt gct gaa aaa ctt act atg gat	2043
Trp Gly Lys Ser Val Asp Ile Leu Gly Ala Glu Lys Leu Thr Met Asp	
435 440 445	
gtg att gtt gat gag ccg acc acg gta tca att gct gca att cca caa	2091
Val Ile Val Asp Glu Pro Thr Thr Val Ser Ile Ala Ala Ile Pro Gln	
450 455 460 465	
ggg cca tca gcc aat tgg gtt aat cca aat cgt gca att aag gtt gag	2139
Gly Pro Ser Ala Asn Trp Val Asn Pro Asn Arg Ala Ile Lys Val Glu	
470 475 480	
cca act aat ttc gta ccg tta gga gat aag ttt aaa gcg gaa tta act	2187
Pro Thr Asn Phe Val Pro Leu Gly Asp Lys Phe Lys Ala Glu Leu Thr	
485 490 495	
ata act tca gct gac tct cca tcg tta gaa gct att gcg atg cat gct	2235
Ile Thr Ser Ala Asp Ser Pro Ser Leu Glu Ala Ile Ala Met His Ala	

500	505	510	
gaa aat aac aac atc aac aac atc att ctt ttt gta gga act gaa ggt Glu Asn Asn Asn Ile Asn Asn Ile Ile Leu Phe Val Gly Thr Glu Gly 515 520 525			2283
gct gat gtt atc tat tta gat aac att aaa gta att gga aca gaa gtt Ala Asp Val Ile Tyr Leu Asp Asn Ile Lys Val Ile Gly Thr Glu Val 530 535 540 545			2331
gaa att cca gtt gtt cat gat cca aaa gga gaa gct gtt ctt cct tct Glu Ile Pro Val Val His Asp Pro Lys Gly Glu Ala Val Leu Pro Ser 550 555 560			2379
gtt ttt gaa gac ggt aca cgt caa ggt tgg gac tgg gct gga gag tct Val Phe Glu Asp Gly Thr Arg Gln Gly Trp Asp Trp Ala Gly Glu Ser 565 570 575			2427
ggt gtg aaa aca gct tta aca att gaa gaa gca aac ggt tct aac gcg Gly Val Lys Thr Ala Leu Thr Ile Glu Glu Ala Asn Gly Ser Asn Ala 580 585 590			2475
tta tca tgg gaa ttt gga tac cca gaa gta aaa cct agt gat aac tgg Leu Ser Trp Glu Phe Gly Tyr Pro Glu Val Lys Pro Ser Asp Asn Trp 595 600 605			2523
gca aca gct cca cgt tta gat ttc tgg aaa tct gac ttg gtt cgc ggt Ala Thr Ala Pro Arg Leu Asp Phe Trp Lys Ser Asp Leu Val Arg Gly 610 615 620 625			2571
gaa aat gat tat gta act ttt gat ttc tat cta gat cca gtt cgt gca Glu Asn Asp Tyr Val Thr Phe Asp Phe Tyr Leu Asp Pro Val Arg Ala 630 635 640			2619
aca gaa ggc gca atg aat atc aat tta gta ttc cag cca cct act aac Thr Glu Gly Ala Met Asn Ile Asn Leu Val Phe Gln Pro Pro Thr Asn 645 650 655			2667
ggg tat tgg gta caa gca cca aaa acg tat acg att aac ttt gat gaa Gly Tyr Trp Val Gln Ala Pro Lys Thr Tyr Thr Ile Asn Phe Asp Glu 660 665 670			2715
tta gag gaa gcg aat caa gta aat ggt tta tat cac tat gaa gtg aaa Leu Glu Glu Ala Asn Gln Val Asn Gly Leu Tyr His Tyr Glu Val Lys 675 680 685			2763
att aac gta aga gat att aca aac att caa gat gac acg tta cta cgt Ile Asn Val Arg Asp Ile Thr Asn Ile Gln Asp Asp Thr Leu Leu Arg 690 695 700 705			2811

aac atg atg atc att ttt gca gat gta gaa agt gac ttt gca ggg aga 2859
 Asn Met Met Ile Ile Phe Ala Asp Val Glu Ser Asp Phe Ala Gly Arg
 710 715 720

gtc ttt gta gat aat gtt cgt ttt gag ggg gct gct act act gag ccg 2907
 Val Phe Val Asp Asn Val Arg Phe Glu Gly Ala Ala Thr Thr Glu Pro
 725 730 735

gtt gaa cca gag cca gtt gat cct ggc gaa gag acg ccg cct gtc gat 2955
 Val Glu Pro Glu Pro Val Asp Pro Gly Glu Glu Thr Pro Pro Val Asp
 740 745 750

gag aag gaa gcg aaa aaa gaa caa aaa gaa gca gag aaa gaa gag aaa 3003
 Glu Lys Glu Ala Lys Lys Glu Gln Lys Glu Ala Glu Lys Glu Glu Lys
 755 760 765

gaa gca gta aaa gaa gaa aag aaa gaa gct aaa gaa gaa aag aaa gca 3051
 Glu Ala Val Lys Glu Glu Lys Lys Glu Ala Lys Glu Glu Lys Lys Ala
 770 775 780 785

atc aaa aat gag gct acg aaa aaa taatctaata aactagttat agggttatct 3105
 Ile Lys Asn Glu Ala Thr Lys Lys
 790

aaaggtctga tgcagatctt ttagataacc tttttttgca taactggaca tagaatggtt 3165

attaaagaaa gcaaggtggt tatacgatat taaaaaggta gcgattttta attgaaacct 3225

ttaataatgt cttgtgatag aatgatgaag taatttaaga gggggaaacg aagtgaaaac 3285

ggaaatttct agtagaagaa aaacagacca agaaatactg caagctt 3332

<210> 8

<211>

<212> PRT

<213> Bacillus sp. KSM-K38

<400> 8

Asp Gly Leu Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Tyr Glu Trp His Leu Glu
 1 5 10 15

Asn Asp Gly Gln His Trp Asn Arg Leu His Asp Asp Ala Ala Ala Leu
 20 25 30

Ser Asp Ala Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly
 35 40 45

Asn Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu
50 55 60

Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys
65 70 75 80

Ala Gln Leu Glu Arg Ala Ile Gly Ser Leu Lys Ser Asn Asp Ile Asn
85 90 95

Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Met Gly Ala Asp Phe Thr
100 105 110

Glu Ala Val Gln Ala Val Gln Val Asn Pro Thr Asn Arg Trp Gln Asp
115 120 125

Ile Ser Gly Ala Tyr Thr Ile Asp Ala Trp Thr Gly Phe Asp Phe Ser
130 135 140

Gly Arg Asn Asn Ala Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Arg Trp Phe His Phe
145 150 155 160

Asn Gly Val Asp Trp Asp Gln Arg Tyr Gln Glu Asn His Ile Phe Arg
165 170 175

Phe Ala Asn Thr Asn Trp Asn Trp Arg Val Asp Glu Glu Asn Gly Asn
180 185 190

Tyr Asp Tyr Leu Leu Gly Ser Asn Ile Asp Phe Ser His Pro Glu Val
195 200 205

Gln Asp Glu Leu Lys Asp Trp Gly Ser Trp Phe Thr Asp Glu Leu Asp
210 215 220

Leu Asp Gly Tyr Arg Leu Asp Ala Ile Lys His Ile Pro Phe Trp Tyr
225 230 235 240

Thr Ser Asp Trp Val Arg His Gln Arg Asn Glu Ala Asp Gln Asp Leu
245 250 255

Phe Val Val Gly Glu Tyr Trp Lys Asp Asp Val Gly Ala Leu Glu Phe
260 265 270

Tyr Leu Asp Glu Met Asn Trp Glu Met Ser Leu Phe Asp Val Pro Leu
275 280 285

Asn Tyr Asn Phe Tyr Arg Ala Ser Gln Gln Gly Gly Ser Tyr Asp Met
290 295 300

Arg Asn Ile Leu Arg Gly Ser Leu Val Glu Ala His Pro Met His Ala
305 310 315 320

Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Glu Ser Leu Glu
325 330 335

Ser Trp Val Ala Asp Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Thr Ile Leu
340 345 350

Thr Arg Glu Gly Gly Tyr Pro Asn Val Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly
355 360 365

Ile Pro Asn Asp Asn Ile Ser Ala Lys Lys Asp Met Ile Asp Glu Leu
370 375 380

Leu Asp Ala Arg Gln Asn Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His Asp Tyr Phe
385 390 395 400

Asp His Trp Asp Val Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Ser Ser Ser Arg
405 410 415

Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asn Gly Pro Gly Gly Ser
420 425 430

Lys Trp Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Gln Thr Trp Thr Asp
435 440 445

Leu Thr Gly Asn Asn Gly Ala Ser Val Thr Ile Asn Gly Asp Gly Trp
450 455 460

Gly Glu Phe Phe Thr Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Tyr Val Asn Gln
465 470 475 480

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis

<400> 9
atggctgata aacaaaccca 20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis

<400> 10
caccacaatg ttcatttgca 20

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis

<400> 11
acagcctttc ttcctcattc t 21

<210> 12
<211> 42
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis

<400> 12
cgtgggtttg tttatcagcc attccgatcc ccccggcgca cg 42

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis

<400> 13
gctgatagaa cgtgacacgg g 21

<210> 14
<211> 42
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis

<400> 14
cgtgggtttg tttatcagcc atgctcattc ctccttgata tg 42

<210> 15
<211> 19
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis

<400> 15
caactaaagc acccattag 19

<210> 16
<211> 44
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis

<400> 16
catttgcaaa tgaacattgt ggtgcttctt caactaacgg ggca 44

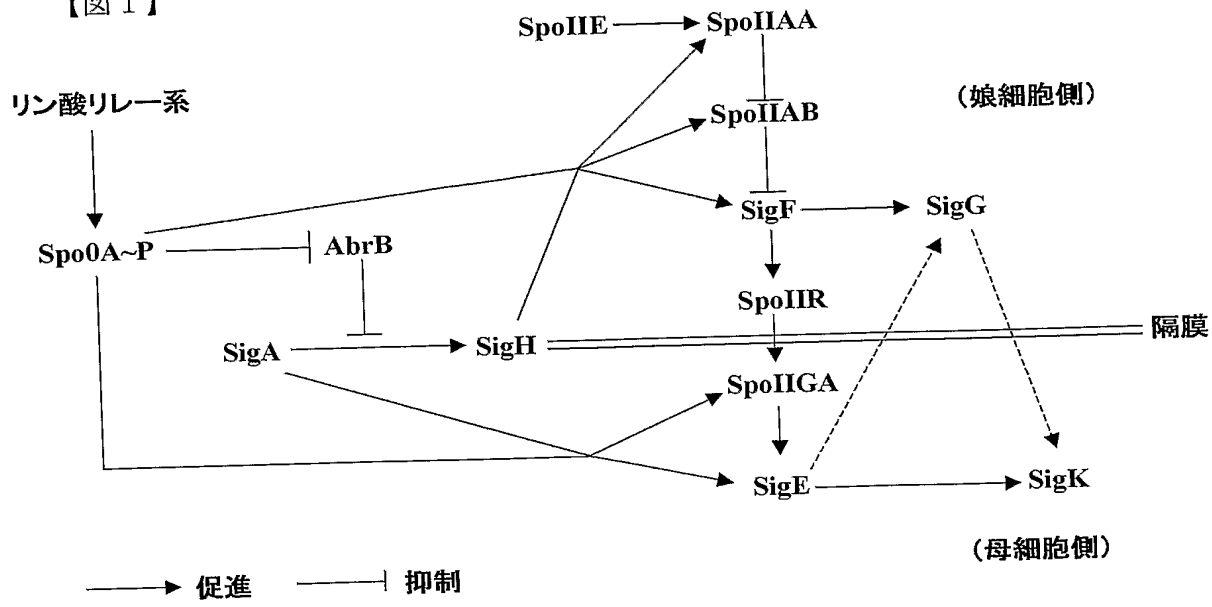
<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis

<400> 17
atagctgata aacaaacca 20

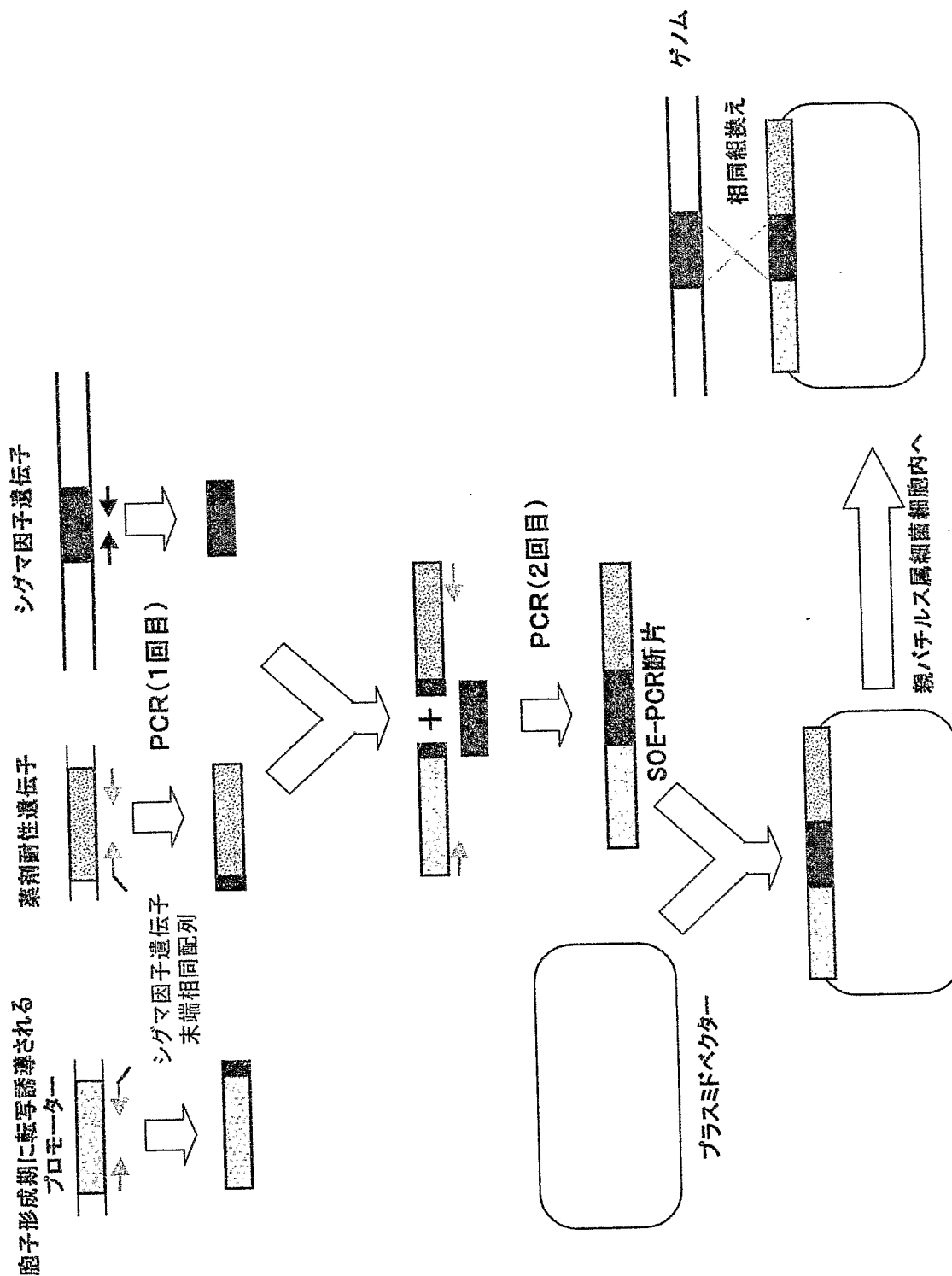
<210> 18
<211> 42
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis

<400> 18
cgtgggtttg tttatcagct atgctcattc ctccttgata tg 42

【書類名】 図面
【図 1】



【図 2】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 タンパク質又はポリペプチドの生産性向上を可能とする変異バチルス属細菌、また当該変異バチルス属細菌に異種タンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入した組換え微生物、更に、当該組換え微生物を用いるタンパク質又はポリペプチドの製造法を提供する。

【解決手段】 s i g A 遺伝子又は当該遺伝子に相当する遺伝子の上流に孢子形成期に特異的に認識、転写されるプロモーター配列が連結してなる DNA を、ゲノム上或いはプラスミド上に有する変異バチルス属細菌、当該変異バチルス属細菌に異種タンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入した組換え微生物、当該組換え微生物を用いるタンパク質又はポリペプチドの製造法。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 4 - 0 6 2 8 5 2
受付番号	5 0 4 0 0 3 7 0 5 8 8
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 6 年 3 月 8 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成16年 3月 5日

特願 2 0 0 4 - 0 6 2 8 5 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 0 9 1 8]

1. 変更年月日	1 9 9 0 年 8 月 2 4 日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都中央区日本橋茅場町 1 丁目 1 4 番 1 0 号
氏 名	花王株式会社